



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**Desarrollo de nuevos tricarbonilos de Re(I) con ligandos bioactivos como  
potenciales antiparasitarios.**

**Mariano Soba Delgado**

**Tesis de Maestría en Química**

Presentada como uno de los requisitos para el título de

**Magíster**

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Abril 2023

**Desarrollo de nuevos tricarbonilos de Re(I) con ligandos bioactivos como  
potenciales antiparasitarios.**

Mariano Soba Delgado

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química  
Universidad de la República  
2023

DIRECTORES

Prof. Titular Dra. Dinorah Gambino  
Facultad de Química, Universidad de la República

Prof. Agregado Dr. Ignacio Machado  
Facultad de Química, Universidad de la República

DIRECTORA ACADÉMICA

Prof. Titular Dra. Dinorah Gambino  
Facultad de Química, Universidad de la República

**Desarrollo de nuevos tricarbonilos de Re(I) con ligandos bioactivos como potenciales antiparasitarios.**

**Tribunal:**

**Dr. Ricardo González**

**Dr. Claudio Olea-Azar**

**Dra. Florencia Tissot**

**Dra. Dinorah Gambino, directora de tesis**

**Dr. Ignacio Machado, director de tesis**

## **Agradecimientos**

El trabajo documentado en esta tesis proviene de una travesía de gran importancia para la vida profesional de alguien que encontró una gran pasión y espíritu de dedicación hacia la ciencia. Como toda travesía que busca descubrir nuevos horizontes, se lleva a cabo en algún medio, cuan aventureros en la antigüedad se lanzaban a aguas desconocidas en un navío, navío en el que uno podía surcar los océanos, pero nunca sólo. Vital es la tripulación que iza las velas, el navegante que traza un rumbo, el contramaestre que asiste en todo imprevisto. Así como un aventurero naval lograba cumplir un objetivo gracias a todos ellos, yo pude completar este hermoso cometido por todos los que me acompañaron. En especial la guía incondicional de mis tutores, la Dra. Dinorah Gambino y el Dr. Ignacio Machado. Difícil dimensionar el agradecimiento por la oportunidad y el apoyo proporcionado por ambos, profesional y personalmente para cumplir con cada tarea propuesta. Su tutela me llevó a expandir ampliamente mi conocimiento en las áreas trabajadas, adquirir un conjunto de nuevas herramientas de excepcional importancia para mi desarrollo como profesional y dejar “la vara muy alta” al tener ejemplos a seguir de tal conocimiento y trayectoria de aquí en más.

Me incorporé más que a un grupo de investigación, a un excelente grupo humano, siempre todos dispuestos a dar una mano y colaborar con los demás. Especial agradecimiento en el grupo para Gonzalo Scalese, amigo con quien compartimos los estudios de grado ahora también colega, encargado de recibirme y capacitarme en los inicios de la maestría en todo lo relacionado a trabajar en el grupo de Química Inorgánica Medicinal y que siempre estuvo para dar una mano y guía en lo que necesitara. Y como si no alcanzaba con uno, Santiago Rostán, otro amigo de la vieja guardia de compañeros de estudio, que se mostró siempre dispuesto a darme una mano en el laboratorio. A ambos les debo que la oportunidad de realizar esta maestría me tocara la puerta, al ellos recomendarme a quienes a futuro serían mis tutores, como candidato a realizarla.

A los colegas Dres. Ricardo Faccio, Leticia Pérez-Díaz y Gilles Gasser que hicieron posible la realización de estudios vitales para cumplir con los objetivos de este trabajo.

Un cálido abrazo todos los nuevos amigos que hice en el camino, sobre todo a los que compartieron incontables horas de laboratorio conmigo y me supieron decir hola día a día.

La odisea para atravesar esas aguas desconocidas terminó siendo un navío atiborrado de grandes colegas y amigos, que hicieron un disfrute el transitar las aguas de la formación profesional y científica. ¡Va mi saludo para todos ellos!

## Resumen

En base a los conocimientos adquiridos por el grupo de Química Inorgánica Medicinal en investigaciones sucesivas, en cuanto a relaciones estructura química – actividad biológica, se propuso como trabajo de tesis el diseño racional de nuevos compuestos antiparasitarios para combatir la enfermedad de Chagas, una de las veinte enfermedades consideradas desatendidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Hoy en día esta enfermedad es tratada con fármacos que sólo son efectivos en la fase aguda de la enfermedad y conllevan muchos efectos nocivos al paciente, generando la necesidad de desarrollar nuevas alternativas. En este contexto, el objetivo general del trabajo de posgrado fue sintetizar y caracterizar nuevos compuestos organometálicos con el centro *fac*-Re(I)(CO)<sub>3</sub>, ya que este tipo de compuestos han sido descritos en los últimos años como una clase de compuestos antiproliferativos prometedores. Estos nuevos compuestos fueron diseñados para que incluyeran en una misma molécula dos ligandos orgánicos bioactivos pertenecientes uno a la familia de derivados bidentados de la 1,10-fenantrolina (NN) y otro a una familia de azoles monodentados como clotrimazol (CTZ) o ketoconazol (KTZ). En este sentido, se sintetizaron y caracterizaron completamente cinco compuestos de fórmula *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(NN)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y el compuesto *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(NN)(KTZ)](PF<sub>6</sub>). Se evaluó su potencialidad como fármacos tripanosomicidas a través de ensayos biológicos *in vitro*, los cuales mostraron buena actividad contra epimastigotas y tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* comparable con la del fármaco de referencia Nifurtimox, y moderada a buena selectividad hacia el parásito en comparación con el modelo de células de mamífero VERO. Se realizaron estudios de propiedades fisicoquímicas de interés biológico tales como lipofilia y estabilidad en solución en diversos medios, donde todos los compuestos probaron ser prominentemente estables. Asimismo, se incursionó en el mecanismo probable de acción mediante el estudio experimental y teórico de dos potenciales blancos: el ADN y la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa (CYP51) involucrada en la ruta biosintética del ergosterol. Se observó que los compuestos sintetizados actúan sobre los mismos blancos que los ligandos libres, primariamente sobre la síntesis del ergosterol, componente vital de la membrana del parásito. Se realizaron estudios metalómicos de captación celular sobre *Trypanosoma cruzi*, que demostraron una baja captación de renio por parte de los parásitos y una asociación preferencial

del compuesto con las proteínas solubles, así como una baja asociación con el ADN. Con este fin, se optimizó y validó un método novedoso para la determinación de renio, proporcionando una nueva herramienta para futuras investigaciones de metalofármacos de renio, con varias ventajas inherentes. Con el fin de profundizar en la localización del compuesto más prometedor en todo el parásito, se realizó microscopía Raman confocal. A pesar de la baja intensidad de estiramiento de los tricarbonilos, se observó que las señales asociadas al ADN sufren cambios en su localización a lo largo del parásito, indicando una posible interacción débil con el compuesto. En resumen, el conjunto completo de resultados demostró la potencialidad de estos nuevos tricarbonilos de Re(I) como candidatos prometedores para el desarrollo de fármacos antitripanosoma.

## Abstract

Based on the knowledge gathered by the Medicinal Inorganic Chemistry group in Montevideo in successive investigations, related to chemical structure – biological activity correlations, the rational design of new antiparasitic compounds to fight Chagas disease, one of the twenty diseases considered neglected by the World Health Organization (WHO), was proposed. Nowadays, the treatment of Chagas Disease involves drugs that are only effective in the acute phase of the disease and have many harmful effects on the patient, generating the need to develop new alternatives. In this context, the general objective of this work was to synthesize and characterize new organometallic compounds with the *fac*-Re(I)(CO)<sub>3</sub> center, since these compounds have been described in recent years as a class of promising antiproliferative compounds. These new compounds were designed to include in the same molecule two bioactive organic ligands, one belonging to the family of bidentate derivatives of 1,10-phenanthroline (NN) and the other one to a family of monodentate azoles, clotrimazole (CTZ) and ketoconazole (KTZ). In this regard, five *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(NN)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) compounds and *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(NN)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) were synthesized and fully characterized. Their potential as trypanosomicidal drugs was evaluated through *in vitro* biological assays, that showed good activity against epimastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, comparable to that of the reference drug Nifurtimox, and moderate to good selectivity towards the parasite compared to the VERO mammalian cell model. Relevant physicochemical properties of biological interest such as lipophilicity and stability in different media were studied, where all compounds proved to be prominently stable. Furthermore, the probable mechanism of action was explored through the experimental and theoretical study of two potential targets: DNA and the enzyme lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase (CYP51) involved in the ergosterol biosynthetic pathway. It was observed that the synthesized compounds act on the same targets as the free ligands, primarily on the synthesis of ergosterol, a vital component of the parasite's membrane. Cellular capture metallomic studies on *Trypanosoma cruzi* were performed, that demonstrated a low rhenium uptake by the parasites and a preferential association of the compound with soluble proteins, as well as a low association with DNA. For this purpose, a novel method for the determination of rhenium was optimized and validated, providing a new tool for future research on rhenium metallo-drugs, with several

inherent advantages. To deepen into the localization of the most promising compound in the whole parasite, confocal Raman microscopy was performed. Despite the low intensity of the tricarbonyls stretching, it was observed that the signals associated to DNA suffer changes in their localization along the parasite, indicating a possible weak interaction with the compound. In summary, the full set of results demonstrated the potential of these novel Re(I) tricarbonyls as promising candidates for further antitrypanosomal drug development.

## Índice

1	INTRODUCCIÓN.....	2
1.1	Los metales como pieza clave en el organismo.....	2
1.2	La Química Inorgánica Medicinal .....	3
1.2.1	Metalofármacos de diagnóstico.....	6
1.2.2	Metalofármacos terapéuticos .....	7
1.2.3	Metalofármacos antiparasitarios .....	7
1.3	Enfermedades tropicales desatendidas .....	8
1.3.1	Enfermedad de Chagas.....	9
1.4	Antecedentes del grupo y de la temática de investigación.....	13
1.5	Diseño racional de metalofármacos.....	13
1.5.1	El renio en compuestos organometálicos .....	14
1.5.2	La relación entre actividad antitumoral y actividad antiparasitaria .....	16
1.5.3	Ligandos bioactivos utilizados en este trabajo .....	17
1.6	Rol de la Química Bioanalítica .....	20
1.6.1	La metalómica .....	21
1.7	Objetivos.....	23
1.7.1	Objetivos generales.....	23
1.7.2	Objetivos específicos.....	23
1.8	Referencias .....	24
2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
2.1	Síntesis de complejos $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{NN})(\text{AZOL})](\text{PF}_6)$ .....	34
2.1.1	Síntesis de $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{CTZ})](\text{PF}_6)$ .....	34
2.1.2	Síntesis de $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{aminophen})(\text{CTZ})](\text{PF}_6)$ .....	35
2.1.3	Síntesis de $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{bipy})(\text{CTZ})](\text{PF}_6)$ .....	36
2.1.4	Síntesis de $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{tmp})(\text{CTZ})](\text{PF}_6)$ .....	38
2.1.5	Síntesis de $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{dmb})(\text{CTZ})](\text{PF}_6)$ .....	39
2.1.6	Síntesis de $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{tmp})(\text{KTZ})](\text{PF}_6)$ .....	39
2.2	Métodos de caracterización.....	41
2.2.1	Caracterización en estado sólido.....	41
2.2.1.1	Análisis elemental .....	41
2.2.1.2	Espectroscopía infrarroja .....	41
2.2.1.3	Difracción de Rayos X.....	41

2.2.2	Caracterización en solución.....	42
2.2.2.1	Resonancia magnética nuclear (RMN).....	42
2.2.2.2	Determinación de renio total mediante espectrometría de emisión atómica .....	42
2.2.2.3	Estudios de lipofilia mediante TLC.....	43
2.2.2.4	Estudios de lipofilia mediante HPLC .....	44
2.2.2.5	Estudios de lipofilia por coeficiente de reparto octanol – PBS .....	44
2.3	Estudios de estabilidad en solución .....	45
2.3.1	Estabilidad en disolventes y en medios biológicos.....	45
2.3.2	Estabilidad en plasma humano .....	46
2.4	Actividad biológica <i>in vitro</i> contra <i>T. cruzi</i> .....	47
2.4.1	Actividad en epimastigotas cepa Dm28c.....	47
2.4.1.1	Actividad contra <i>T. cruzi</i> y citotoxicidad inespecífica en células HeLa .....	47
2.4.2	Actividad en tripomastigotas cepa CL Brener.....	48
2.4.2.1	Actividad contra <i>T. cruzi</i> y citotoxicidad inespecífica en células VERO .....	49
2.5	Estudio del mecanismo de acción .....	50
2.5.1	Inhibición de la biosíntesis de ergosterol .....	50
2.5.2	Acoplamiento molecular e interacción con enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa.....	51
2.5.3	Interacción con el ADN.....	51
2.6	Metalómica .....	52
2.6.1	Estudios de captación celular y distribución subcelular en <i>T. cruzi</i> .....	52
2.6.2	Microscopía RAMAN confocal.....	52
2.7	Referencias .....	53
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	58
3.1	Síntesis.....	58
3.2	Caracterización en estado sólido .....	59
3.2.1	Análisis elemental .....	59
3.2.2	Análisis mediante espectroscopía infrarroja .....	60
3.2.3	Difracción de Rayos X.....	62
3.3	Caracterización de los compuestos en solución.....	66
3.3.1	Resonancia magnética nuclear.....	66
3.3.2	Determinación de renio total mediante espectrometría de emisión atómica .....	70
3.3.2.1	Validación del método analítico mediante MP-AES .....	72
3.4	Estudios de lipofilia .....	75

3.4.1	Resultados de los estudios de lipofilia mediante TLC .....	76
3.4.2	Resultados de los estudios de lipofilia mediante HPLC .....	77
3.4.3	Resultados de los estudios de lipofilia por coeficiente de reparto octanol – PBS .....	79
3.5	Estabilidad en solución.....	80
3.5.1	Resultados de los estudios de estabilidad.....	81
3.6	Actividad biológica <i>in vitro</i> contra <i>T. cruzi</i> .....	90
3.6.1	Actividad <i>in vitro</i> en epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cepa Dm28c, citotoxicidad sobre células HeLa y selectividad hacia el parásito.....	90
3.6.2	Actividad <i>in vitro</i> en tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> cepa CL Brener, citotoxicidad sobre células VERO y selectividad hacia el parásito .....	91
3.7	Mecanismo de acción.....	93
3.7.1	Inhibición de la biosíntesis del ergosterol .....	93
3.7.2	Interacción con lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa: acoplamiento molecular .....	95
3.7.3	Resultados de la interacción de los compuestos con ADN .....	95
3.7.4	Acoplamiento molecular con ADN .....	97
3.8	Estudios de metalómica .....	98
3.8.1	Estudios de metalómica mediante espectrometría atómica .....	98
3.8.1.1	Estudios de renio captado por epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	99
3.8.1.2	Distribución subcelular de renio en epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	100
3.8.2	Microscopía Raman confocal .....	101
3.9	Referencias .....	104
4	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	110
4.1	Conclusiones .....	110
4.2	Perspectivas .....	112
5	ANEXO.....	114
5.1	Presentaciones en eventos .....	114
5.2	Publicaciones .....	115
5.3	Materiales complementarios .....	116

## Lista de Tablas

Tabla 1. Derivados de la 1,10-fenantrolina utilizados como ligandos bioactivos .....	17
Tabla 2. Gradiente utilizado para estudios de estabilidad en solución .....	45
Tabla 3. Compuestos sintetizados durante el trabajo de tesis.....	58
Tabla 4. Composiciones porcentuales teóricas y valores experimentales obtenidos a partir del análisis elemental.....	59
Tabla 5. Asignación tentativa de bandas del espectro IR de los compuestos. ....	61
Tabla 6. Datos cristalográficos y refinamiento de la estructura para los polimorfos triclinico y monoclinico del compuesto <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ).....	63
Tabla 7. Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del metal en el polimorfo triclinico del complejo [Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ). ....	65
Tabla 8. Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del metal en los dos confórmeros del polimorfo monoclinico del complejo [Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ). ....	65
Tabla 9. Programa de temperatura para la determinación de renio por ET-AAS. ....	73
Tabla 10. Principales cifras analíticas de mérito obtenidas tras la validación de renio por MP-AES.....	74
Tabla 11. Análisis elemental de renio total mediante MP-AES. ....	74
Tabla 12. Resultados de ensayo de lipofilia mediante TLC.....	76
Tabla 13. Datos cromatográficos y parámetros R <sub>F</sub> y R <sub>M</sub> para cada compuesto. ....	78
Tabla 14. Coeficientes de distribución de los complejos <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (NN)(azol)](PF <sub>6</sub> ) en octanol – buffer PBS.....	79
Tabla 15. Estabilidad en DMSO 100%. ....	81
Tabla 16. Estabilidad DMSO: medio símil biológico (50:50).....	83
Tabla 17. Estabilidad en DMSO: medio BHI complementado (50:50).....	84
Tabla 18. Resultados de estabilidad de los compuestos <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (NN)(AZOL)](PF <sub>6</sub> ) a diferentes tiempos de incubación en plasma humano, utilizando cafeína como patrón interno. ....	88
Tabla 19. Resultados de IC <sub>50</sub> en <i>T. cruzi</i> (epimastigotas Dm28c) y células HeLa.....	91
Tabla 20. Resultados de IC <sub>50</sub> en <i>T. cruzi</i> (tripomastigotas CL Brener) y células VERO. ....	92
Tabla 21. Resultados de la cuantificación de escualeno, lanosterol y ergosterol en epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tras 4 h de incubación con <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ). ....	94
Tabla 22. Resultados de la cuantificación de escualeno, lanosterol y ergosterol en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> tras 4 h de incubación con CTZ. ....	94

Tabla 23. Porcentajes de renio captado por los parásitos después de 4 h y 24 h de incubación con $1\times$ y $10\times$ la $IC_{50}$ calculado para $fac-[Re(I)(CO)_3(tmp)(CTZ)](PF_6)$ sobre epimastigotas de <i>T. cruzi</i> . ....	99
Tabla 24. Porcentaje de renio asociado a las diferentes biomacromoléculas aisladas tras 4 h de tratamiento con $1\times$ y $10\times$ la $IC_{50}$ calculada de $fac-[Re(I)(CO)_3(tmp)(CTZ)](PF_6)$ en epimastigotas de <i>T. cruzi</i> . ....	100

## Lista de Figuras

Figura 1. Algunos metalofármacos y potenciales metalofármacos descritos en la literatura científica....	5
Figura 2. Ejemplos de metalofármacos antiparasitarios.....	8
Figura 3. Centro: imagen del parásito. Laterales: Imágenes de insectos triatominos.....	9
Figura 4. Población mundial estimada actual infectada por <i>T. cruzi</i> . Fuente: Patterson & Guhl (2010). Geographical Distribution of Chagas Disease. American Trypanosomiasis, 83–114.....	10
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fuente: Sitio web «Centers for Disease Control and Prevention (CDC)» [21]. .....	11
Figura 6. Fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	13
Figura 7. Representación del centro <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> ] (X,Y,Z representan las posiciones de coordinación libres).....	15
Figura 8. Estructuras de los ligandos derivados de la 1,10-fenantrolina utilizados.....	18
Figura 9. Esquema de la biosíntesis de esteroides en epimastigotas de <i>T. cruzi</i> . Fuente: Journal of Chromatography B 1061–1062 (2017) 225–232.....	19
Figura 10. Azoles utilizados como ligandos. Izquierda clotrimazol. Derecha ketoconazol.....	20
Figura 11. Ruta general de síntesis.....	34
Figura 12. Espectros IR en el rango 1800 - 2200 cm <sup>-1</sup> incluyendo las bandas correspondientes a los estiramientos C-O de los carbonilos del centro metálico.....	60
Figura 13. Comparación del espectro IR del complejo <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(tmp)](PF <sub>6</sub> ) y sus ligandos libres tmp y CTZ, a modo de ejemplo.....	61
Figura 14. Representación del complejo [Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ) en su forma polimórfica triclinica de su sal de hexafluorofosfato.....	64
Figura 15. Numeración de los hidrógenos utilizada para los estudios mediante RMN.....	66
Figura 16. Arriba: Espectro del complejo <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ). Centro: Espectro de CTZ. Abajo: Espectro de 1,10-fenantrolina.....	68
Figura 17. Cromatograma obtenido a partir de la mezcla de los seis complejos y amarillo tartrazina. a) amarillo tartrazina, b) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ), c) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ), d) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ), (e) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ), f) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ), g) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(KTZ)](PF <sub>6</sub> ).....	77
Figura 18. Cromatogramas de ensayo de estabilidad de [Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ) en DMSO 100 %, a modo de ejemplo.....	82
Figura 19. Cromatogramas de ensayo de estabilidad de [Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ) en DMSO: medio símil biológico (50:50), a modo de ejemplo.....	83
Figura 20. Cromatogramas de ensayo de estabilidad de <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ) en BHI 100 %, a modo de ejemplo.....	85
Figura 21. Cromatogramas obtenidos para a) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ), b) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ) y c) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ) a t=0 y t=1 día, respectivamente.....	85
Figura 22. Cromatogramas obtenidos para d) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ), e) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ) y f) <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(KTZ)](PF <sub>6</sub> ) a t=0 y t=1 día, respectivamente.....	86
Figura 23. Cromatogramas obtenidos para el compuesto <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(KTZ)](PF <sub>6</sub> ) a t = 0 y t = 24 h. ....	89
Figura 24. Espectros de absorción electrónica de <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> ) en ausencia (línea gris) y en presencia (líneas de color) de CT-DNA. La flecha muestra los cambios tras la adición de una cantidad	

creciente de CT-DNA. (CT-DNA = 0-20 $\mu$ M, complejo C = 10 $\mu$ M, muestras preparadas en medio DMSO/buffer Tris HCl, pH 7,4).....	96
Figura 25. Modelo de <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)] <sup>+</sup> (a) y <i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)] <sup>+</sup> (b) acoplado en el surco mayor de CT-DNA. En (c) y (d), las interacciones intermoleculares entre el sustrato y el CT-DNA se muestran para (a) y (b), respectivamente. Pi-sigma = interacción C-H- $\pi$ ; conventional = enlace de H convencional; Carbon = enlace de H C-H. Código de color del átomo: C (gris), N (azul), O (rojo), Cl (verde), H (blanco). .....	98
Figura 26. a) Superposición entre imágenes Raman ópticas y confocales obtenidas del análisis de componentes principales seleccionados para muestras: control, 1 $\times$ IC <sub>50</sub> 4 h, 1 $\times$ IC <sub>50</sub> 24 h, 10 $\times$ IC <sub>50</sub> 4h y 10 $\times$ IC <sub>50</sub> 24 h. b) Espectros Raman promedio para cada componente, correspondientes a las imágenes Raman confocales presentadas en (a). .....	103

## **Lista de Abreviaturas**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AgOTf:** Triflato de plata.

**Aminophen:** 5-amino-1-10-fenantrolina.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**Bipy:** 2,2'-bipiridina.

**CDK:** Quinasas dependientes de ciclinas.

**CYP51:** Enzima lanosterol 14 alfa-desmetilasa.

**DALYs:** Años de vida ajustados por discapacidad.

**Dmb:** 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**DMSO-d6:** Dimetilsulfóxido deuterado.

**ETD:** Enfermedades tropicales desatendidas.

**EUA:** Estados Unidos de América.

**GC:** Cromatografía gaseosa.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución.

**IC<sub>50</sub>:** concentración que inhibe el crecimiento al 50 %.

**MeOH:** Metanol.

**MP-AES:** Espectrometría de emisión atómica por plasma inducido por microondas.

**MS:** Espectrometría de masas.

**NN:** Derivados de la 1,10-fenantrolina.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PBS:** Buffer fosfato salino.

**Phen:** 1-10, fenantrolina.

**RPMI:** Medio de cultivo celular Rosewll Park Memorial Institute 1640.

**SRM:** Material de referencia estándar.

**TGR:** Tiorredoxina glutatión reductasa.

**THF:** Tetrahidrofurano

**Tmp:** 4,3,7,8-tetrametil-1-10-fenantrolina.

# **CAPÍTULO 1**

# **INTRODUCCIÓN**

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Los metales como pieza clave en el organismo

La incorporación de metales en la investigación en el ámbito medicinal, enfocada al desarrollo de potenciales fármacos, ha tomado cada vez más relevancia en la comunidad científica internacional.

Los metales tienden fácilmente a perder electrones y a solubilizarse en medios biológicos en sus formas catiónicas. Las moléculas biológicas, como las proteínas y el ADN, suelen ser muy ricas en electrones, siendo la atracción debida a estas cargas opuestas propicia para la interacción y formación de enlaces entre éstas y los cationes metálicos. Asimismo, son muy comunes las interacciones de metales con moléculas pequeñas como el oxígeno ( $O_2$ ). Debido a esto, es muy común la presencia de metales involucrados en varias funciones biológicas esenciales a nivel de nuestro organismo [1].

Las funciones biológicas que involucran la presencia y acción directa de metales son muy variadas. A modo de ejemplo, la hemoglobina se enlaza a oxígeno a través de un átomo de hierro, pudiendo transportar esta molécula esencial para la vida a los tejidos biológicos. Asimismo, en el núcleo de las células, el zinc (Zn) provee el marco estructural para la regulación de la función de los genes. De manera similar, el calcio (Ca) es base para el marco estructural de todo nuestro organismo, formando parte de los minerales que componen los huesos. Metales como cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc forman parte de las metaloenzimas que facilitan una gran variedad de reacciones necesarias para la vida [1].

Como se puede apreciar, la importancia de los metales en el organismo no radica meramente en la presencia y consecuentes efectos del metal individual, sino que abarca a los compuestos formados por estos. Es conocido que el organismo humano necesita de la vitamina  $B_{12}$ , que presenta cobalto como un centro metálico en su estructura, más no se conoce necesidad de cobalto per se, no habiéndose reportado problemas de salud por deficiencias de este elemento por fuera de su rol constitutivo en la vitamina  $B_{12}$  [2].

Los compuestos organometálicos, son compuestos que presentan al menos un enlace covalente metal-carbono. Estos adquieren relevancia en un contexto biológico cuando el metal se encuentra como centro de coordinación en una estructura molecular que posee una actividad biológica determinada. Es de destacar que los metales como centros de coordinación forman enlaces de un carácter más débil ( $50 - 150 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) que las interacciones covalentes entre átomos de carbono ( $300 - 400 \text{ kJ mol}^{-1}$  para un enlace C-C simple), permitiendo una mayor flexibilidad para la formación y disociación de enlaces en condiciones biológicas. Estas interacciones suelen cumplir un rol vital en el reconocimiento de posibles blancos de acción durante el desarrollo de potenciales metalofármacos [3].

Dada la amplia participación de metales en las diversas funciones biológicas del organismo y a su incorporación en moléculas complejas que cumplen roles vitales, es que surge un área de investigación muy importante denominada Química Inorgánica Medicinal, que tiene como uno de sus objetivos principales el diseño racional de fármacos que contengan centros metálicos u organometálicos en su estructura.

En este contexto, los compuestos de coordinación constituyen una herramienta muy interesante y versátil, a partir de los cuales se pueden desarrollar potenciales metalofármacos, mediante la combinación de centros metálicos u organometálicos con ligandos bioactivos, con el fin de que el producto final posea una actividad biológica incrementada.

## **1.2 La Química Inorgánica Medicinal**

La Química Inorgánica Medicinal es un área de investigación muy prominente, impulsada principalmente por el desarrollo del cisplatino (*cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]) en la década de los años 60, el cual es un reconocido fármaco antitumoral basado en platino (Pt) como centro metálico. Asimismo, dentro de esta disciplina científica se ha destacado el uso de distintos centros metálicos con la premisa de aumentar la eficacia de fármacos orgánicos. A la fecha, los compuestos de platino siguen siendo líderes en el tratamiento quimioterápico de varios tipos de cáncer, y sus efectos y efectividad no han sido replicados por ningún compuesto orgánico, demostrando el rol vital de la interacción metal-biomolécula en la actividad biológica del compuesto [1].

El campo de la Química Inorgánica Medicinal abarca una amplia gama de temas de interés [4], entre los cuales se destacan:

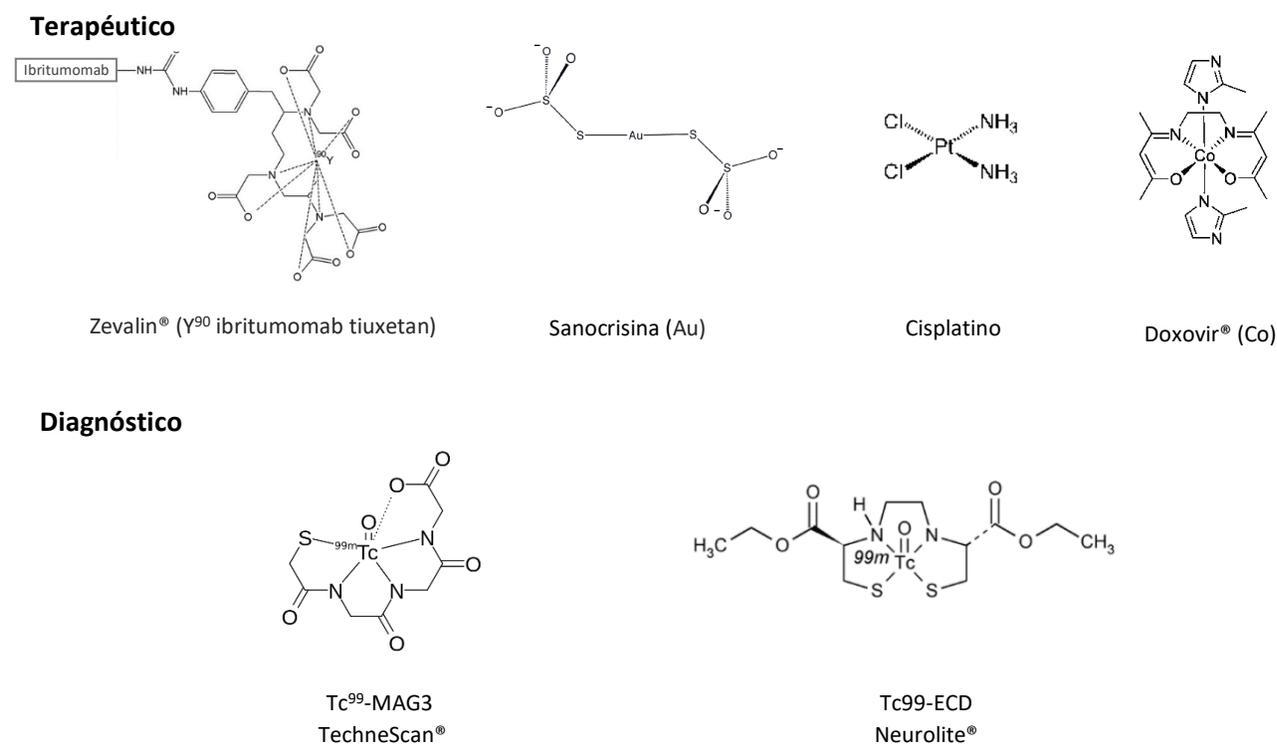
- El desarrollo de productos a base de metales con fines terapéuticos y de diagnóstico de agentes de enfermedades humanas.
- La investigación del papel de los iones metálicos, las metaloproteínas y la homeostasis de los iones metálicos en salud y enfermedad.
- El diseño de agentes quelantes para uso en el tratamiento de sobrecarga de iones metálicos o exposición a iones metálicos tóxicos.
- La elucidación de las funciones generales, a nivel molecular, de iones metálicos endógenos y exógenos en los sistemas vivos.
- Suplementación de metales esenciales.

En términos generales, la Química Inorgánica Medicinal se desarrolla en dos contextos, cuando se trabaja sobre un metal que ya está presente en el organismo, o cuando se introduce intencionalmente al mismo un metal con un fin terapéutico o de diagnóstico.

Cabe destacar que los estudios relacionados con la quelación de iones metálicos se utilizan tanto para evitar los efectos negativos derivados del exceso de un metal esencial, como para combatir la intoxicación por la presencia de un metal tóxico. En el sentido opuesto es notoria la contribución de esta área a la suplementación de metales esenciales, potenciando la incorporación al organismo de dichos elementos.

El hecho de introducir un compuesto metálico al organismo puede ser con el propósito de realizar un diagnóstico o como parte de un tratamiento. Para el investigador Peter Sadler [5], la mayor parte de los elementos de la tabla periódica, hasta el bismuto inclusive (ya que la radioactividad asociada a muchos elementos de mayor número atómico suele presentar serios problemas de toxicidad), son utilizados en metalofármacos. Asimismo, pueden utilizarse tanto metales esenciales como no esenciales. Cabe destacar que algunos radionucleidos metálicos poseen amplio uso en la realización de estudios diagnósticos por imagenología molecular, como es el caso del tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), y otros se utilizan en agentes terapéuticos, como es el caso del itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

El uso de compuestos metálicos en el ámbito de la salud depende en gran medida de su capacidad para superar la barrera que supone la noción colectiva de toxicidad asociada a muchos de los metales, en especial por los peligros asociados a elementos como mercurio (Hg), plomo (Pb) y cromo (Cr). Esto revela la necesidad de establecer que los compuestos metálicos pueden ser diseñados para presentar ciertas propiedades, tales que su uso sea seguro y su actividad biológica sea específica [5]. En la Figura 1 se muestran algunos ejemplos de metalofármacos exitosos en uso clínico o en fase clínica (Doxovir).



**Figura 1. Algunos metalofármacos y potenciales metalofármacos descritos en la literatura científica.**

En este contexto, la Química Inorgánica Medicinal provee de una disciplina con la potencialidad de descubrir nuevos fármacos de base metálica, con el fin de actuar sobre diversos problemas a nivel de la Salud Pública. Estos nuevos fármacos se diseñan según diferentes escenarios [6]:

- Un metal que posee una determinada acción biológica puede ver mejorada su capacidad para alcanzar ciertos blancos de acción y mejorar su biodisponibilidad, gracias a la unión con ligandos no necesariamente bioactivos. Estos ligandos pueden además disminuir los efectos

tóxicos del metal, al dirigirlo a sitios de acción específicos, evitando que se encuentre disponible para participar en reacciones no deseadas, como inhibiciones enzimáticas u otras reacciones dañinas para el organismo [6].

- Desarrollar una actividad que ni el ion metálico ni el ligando presentan, siendo la especie generada, y no el ion metálico o los ligandos, la que presenta actividad biológica. El ejemplo más importante es el del fármaco antitumoral cisplatino (Figura 1). Éste incluye en la esfera de coordinación del Pt(II) ligandos cloruro y amino que por separado no muestran ninguna actividad farmacológica. Sin embargo, la especie de Pt(II) generada por coordinación muestra una importante actividad antiproliferativa.
- El metal es utilizado para formar complejos bioactivos gracias a su combinación con uno o varios ligandos que presenten actividad biológica por si mismos [5]. Puede generarse un efecto sinérgico entre el centro metálico y los ligandos utilizados, que potencie la actividad farmacológica de los ligandos libres sin coordinar, así como una mejora de los efectos biológicos debido a la presencia del metal en el compuesto. Los posibles cambios de las características fisicoquímicas al formarse un complejo (lipofilia, solubilidad, estabilidad) pueden afectar positivamente la biodisponibilidad y mejorar la efectividad al aumentar el tiempo de residencia en el organismo [6].
- La coordinación de un ligando bioactivo a un ion metálico obviamente modifica las propiedades fisicoquímicas y electrónicas del mismo, lo cual abre la puerta a que se puedan burlar fenómenos de resistencia. El compuesto de coordinación generado tendrá una estructura que puede no ser reconocida por los mecanismos de resistencia al ligando desarrollados por células tumorales o microorganismos.

### **1.2.1 Metalofármacos de diagnóstico**

Los metalofármacos han cumplido un importante rol como herramientas de diagnóstico y terapia. En este sentido, la imagenología molecular permite visualizar, caracterizar y medir procesos moleculares a nivel celular, y en este ámbito cobran relevancia los radiofármacos, conocidos por su utilidad a la hora de diagnosticar ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiológicas, infecciones, desórdenes neurológicos, entre otros trastornos. Los metalofármacos han supuesto

una mejora importante en cuanto a la calidad de los métodos de diagnóstico en comparación con métodos previos menos sensibles. Incluso, han permitido diferenciar tejidos carcinogénicos y tejidos sanos, previo al análisis de una toma física de tejido [7]. En este marco, se destacan los radiofármacos de Tecnecio-99m [8], siendo éste el radionucleido de mayor uso en la actualidad, gracias a sus características fisicoquímicas, a su tiempo de vida media que permite su utilización sin exponer al paciente a una radiación excesiva, a la ausencia de emisión de partículas radiotóxicas ( $\alpha$  o  $\beta$ ) y a su producción de bajo costo.

### **1.2.2 Metalofármacos terapéuticos**

Una gran variedad de metalofármacos terapéuticos se han desarrollado y aprobado para su uso clínico, así como muchos otros se encuentran en fase de prueba. Entre ellos pueden encontrarse anticancerígenos [9,10], radiofármacos terapéuticos, antibióticos y antiinflamatorios [11], antiparasitarios [12], antiartríticos, antivirales, antidiabéticos, psicotrópicos, y fármacos para tratar desórdenes cardiovasculares, gastrointestinales, entre otros [7].

### **1.2.3 Metalofármacos antiparasitarios**

Algunos de los primeros metalofármacos utilizados en terapia fueron agentes antimicrobianos y antiparasitarios a base de arsénico [13]. En el año 1907, se reportó el uso de atoxilo, un fármaco a base de arsénico, en el tratamiento de la tripanosomiasis [14]. Desde entonces, se han desarrollado diversos metalofármacos, por ejemplo, compuestos de antimonio como el Solustibosan y el Pentostam [15,16], y compuestos prometedores actualmente en fase clínica como el compuesto organometálico de hierro, ferroquina [17]. En la figura 2 se pueden apreciar la estructura de algunos de los compuestos mencionados.

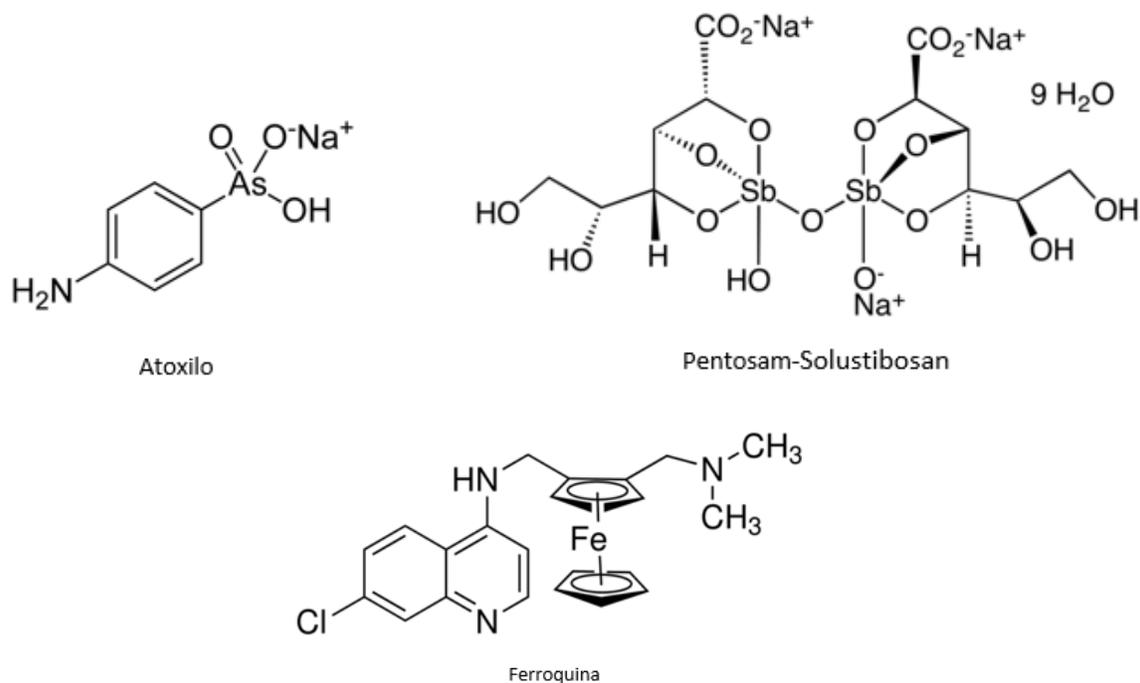


Figura 2. Ejemplos de metalofármacos antiparasitarios.

### 1.3 Enfermedades tropicales desatendidas

Las enfermedades tropicales desatendidas, son un grupo de enfermedades que ocurren bajo condiciones de clima tropical y subtropical, y que se encuentran íntimamente ligadas a la pobreza, por lo que prosperan en áreas donde no existe el acceso a agua potable o un saneamiento adecuado, donde la atención médica es limitada, y la población vive en proximidad con animales y vectores de enfermedades infecciosas [18].

En conjunto suponen pérdidas humanas y económicas importantes a nivel mundial, pero no parecen representar una prioridad para la industria farmacéutica a nivel global, a pesar de ser enfermedades discapacitantes e inhabilitantes. Esto se debe en gran parte a no suponer una inversión rentable. Son enfermedades de poblaciones desatendidas que perpetúan un ciclo de dificultades a nivel económico, educativo y oportunidades profesionales limitadas. Además, se asocian con el estigma y la exclusión social [18,19].

En 2010 se calculó que este conjunto de enfermedades causó unos 26,06 millones de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs), indicador que resume el impacto de la mortalidad y discapacidad asociado a una enfermedad mediante estudios de carga de ésta. A modo comparativo, este valor de DALYs es el doble que los causados por la hepatitis, e igual a la suma de los DALYs para cáncer de mama, colon y recto, respectivamente [20].

### 1.3.1 Enfermedad de Chagas

Dentro de las enfermedades tropicales desatendidas se encuentra la enfermedad de Chagas, una enfermedad parasitaria endémica que representa un problema de salud acuciante en las regiones más pobres de América Latina. Debido a la falta de una quimioterapia adecuada para su correcto tratamiento, es que se requiere con gran urgencia el desarrollo de nuevos fármacos más eficientes y menos tóxicos.

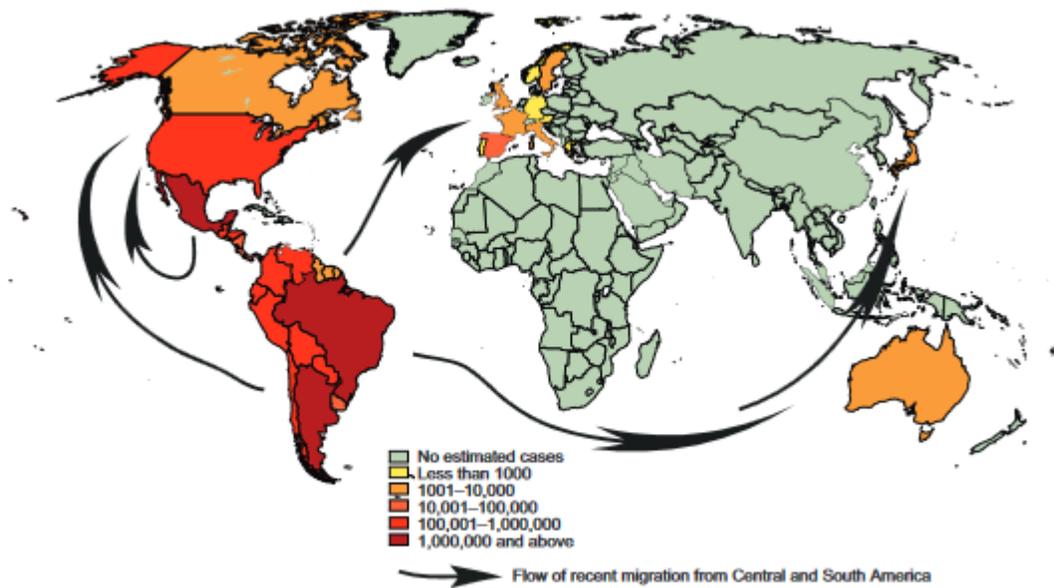
De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) [19]. Se estima que entre 6 y 7 millones de personas en todo el mundo están infectadas con el parásito *T. cruzi*. La enfermedad de Chagas se encuentra principalmente en áreas endémicas de 21 países latinoamericanos continentales, donde se transmite principalmente cuando los humanos entran en contacto con heces y/o orina de insectos triatominos (Figura 3) chupadores de sangre infectados (transmisión por vectores).



Figura 3. Centro: imagen del parásito. Laterales: Imágenes de insectos triatominos.

La enfermedad de Chagas alguna vez estuvo completamente confinada a la Región de las Américas. Sin embargo, en las últimas décadas el patrón epidemiológico de la enfermedad

cambió de una enfermedad rural a una enfermedad mayoritariamente urbana, principalmente debido a la movilidad poblacional, la urbanización y la migración (en la Figura 4 se representa el fenómeno de globalización por migración). Como consecuencia, se ha detectado un mayor número de casos en Canadá y Estados Unidos de América, así como en regiones de Europa, el Mediterráneo Oriental y el Pacífico Occidental. Debido a la gran cantidad de personas que permanecen sin diagnóstico o tratamiento, combinado con las áreas con transmisión activa restantes, se estima que 75 millones de personas corren el riesgo de infección.



**Figura 4. Población mundial estimada actual infectada por *T. cruzi*. Fuente: Patterson & Guhl (2010). Geographical Distribution of Chagas Disease. American Trypanosomiasis, 83–114.**

El parásito muestra un ciclo de vida complejo involucrando etapas en los insectos infectados (tripomastigotas metacíclicos no replicativos y epimastigotas no infecciosos) y en el hospedero humano (tripomastigotas infectivos móviles y amastigotas replicativos intracelulares) (Figura 5), que muestran diferente susceptibilidad a fármacos [21].

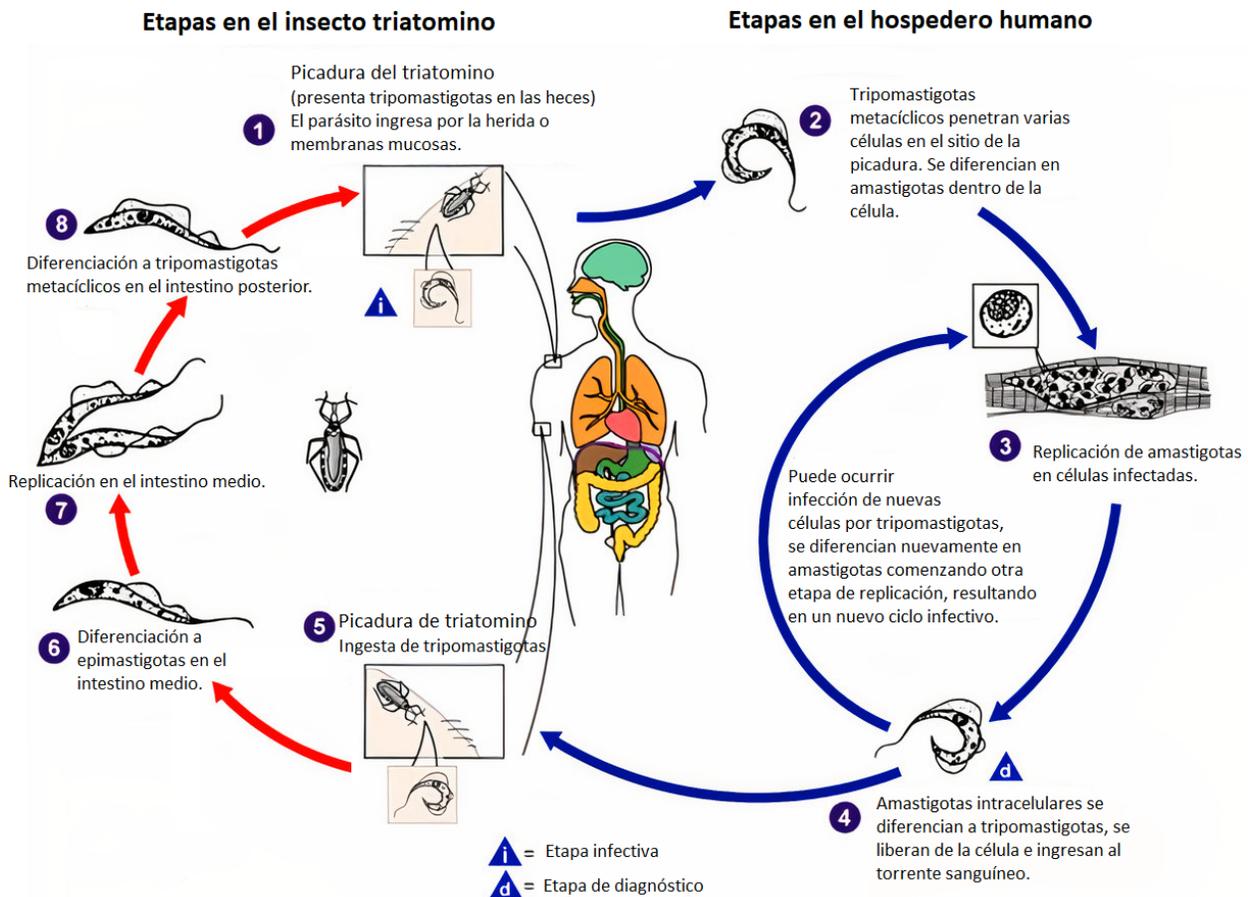


Figura 5. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Fuente: Sitio web «Centers for Disease Control and Prevention (CDC)» [21].

Los parásitos ingresan al huésped mamífero de distintas maneras: i) cuando la persona, sin darse cuenta, refrega los desechos del insecto en la picadura u otra herida en la piel, los ojos o la boca, siendo ésta por amplio margen la más frecuente, ii) a través de transfusiones de sangre, iii) al realizarse un transplante de órganos de donantes infectados, iv) por transmisión congénita (de madre a hijo) durante el embarazo o el parto, v) por el consumo de alimentos que han sido contaminados con desechos de triatomino infectados, típicamente infectando a grupos de personas (causando brotes).

La enfermedad se caracteriza por tener dos etapas, una fase aguda y una fase crónica. Ambas fases pueden darse tanto de manera asintomática como representar un serio riesgo de vida [21]. Durante la fase aguda, que puede tener una duración de semanas a meses desde el inicio de la infección, una persona puede no presentar síntomas o tener síntomas leves, como fiebre, fatiga,

dolores corporales, dolor de cabeza, erupción cutánea, pérdida de apetito, diarrea y vómitos. Debido a que estos síntomas son similares a los de otras enfermedades, la mayoría de las personas no reconocen que su enfermedad es por infección con el parásito *T. cruzi*. Durante la fase crónica, que puede durar décadas o incluso la totalidad de la vida de la persona infectada, la mayoría de las personas no presentan síntomas. Aproximadamente entre el 20 y el 30 % de las personas infectadas desarrollan complicaciones cardíacas (que pueden incluir corazón agrandado, insuficiencia cardíaca, alteración de la frecuencia o el ritmo cardíaco e incluso paro cardíaco) y/o complicaciones gastrointestinales (que pueden incluir esófago o colon agrandado, provocando dificultades para comer o defecar) [21].

En mayo de 2019, dando seguimiento a la decisión de la 72<sup>o</sup> Asamblea Mundial de la Salud, se estableció el Día Mundial de la Enfermedad de Chagas, el cual pasó a celebrarse el 14 de abril, fecha en que Carlos Chagas diagnosticó el primer caso humano de la enfermedad en el año 1909 [19]. Cabe destacar que la pérdida económica anual estimada a nivel global a causa de esta enfermedad es de 627,46 millones de dólares en costos de atención médica, recayendo un 78,35 % en América Latina [22]. Esto constituye un factor adicional al deterioro de la situación económica de las zonas pobres más afectadas por la misma.

En la actualidad, esta enfermedad es tratada con dos compuestos nitrogenados heterocíclicos desarrollados entre las décadas de los 60 y 70, denominados Nifurtimox y Benznidazol (Figura 6). Sin embargo, ambos fármacos sólo son efectivos en fases agudas de la enfermedad y conllevan muchos efectos nocivos al paciente tratado. Esto genera la necesidad de desarrollar nuevos fármacos que permitan tratar la enfermedad no sólo en la fase más aguda, y que, además, posean menores efectos nocivos secundarios.

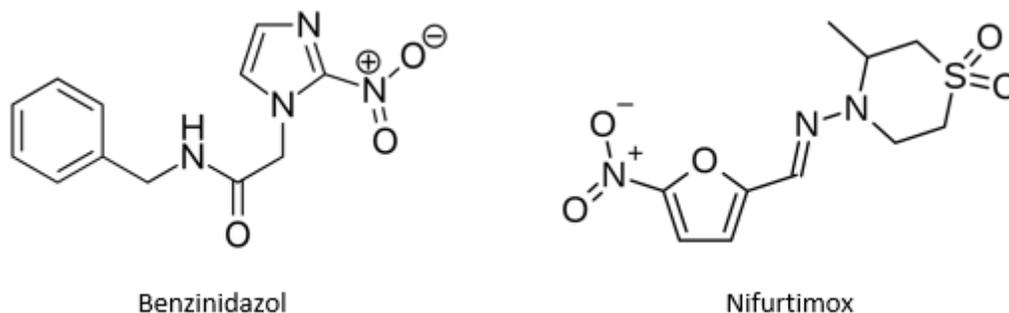


Figura 6. Fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

#### 1.4 Antecedentes del grupo y de la temática de investigación

El grupo de Química Inorgánica Medicinal de Facultad de Química, liderado por la Dra. Dinorah Gambino, ha trabajado durante varios años en el diseño racional de potenciales metalofármacos contra enfermedades de alta incidencia regional, desarrollando numerosos compuestos como potenciales fármacos y aportando vasto conocimiento en la temática [23-32]. Este grupo se ha centrado en la estrategia de hibridación de agrupamientos bioactivos, “metal o centro organometálico + ligando orgánico bioactivo”, que conduce en muchos casos a compuestos metálicos con propiedades biológicas mejoradas, que presentan actividades incrementadas respecto a los ligandos bioactivos utilizados en forma individual, y que afectan potencialmente múltiples blancos de acción [33-34].

En base a los conocimientos adquiridos por el grupo en investigaciones sucesivas a lo largo de los años, en cuanto a relaciones estructura química – actividad biológica, es que se ha enfocado el trabajo fundamentalmente al diseño racional de nuevos compuestos antiparasitarios, en particular para combatir la enfermedad de Chagas.

#### 1.5 Diseño racional de metalofármacos

Las investigaciones llevadas a cabo en el marco de la Química Inorgánica Medicinal han demostrado la capacidad para desarrollar potenciales fármacos a base de metales para el tratamiento de enfermedades parasitarias [35-37]. La tendencia actual apunta a un desarrollo racional de los potenciales metalofármacos, proceso por el cual se seleccionan racionalmente

distintos aspectos estructurales asociados al metalofármaco, de manera de modular el perfil farmacológico del mismo.

La elección del metal y su estado de oxidación (y, por lo tanto, también de la geometría de coordinación), el tipo y número de ligandos y posibles coligandos, los contraiones, entre otros factores, son todas variables que tienen implicancia a nivel de la actividad biológica. Por lo tanto, el control de estos factores es primordial durante el diseño racional de compuestos. La elección de estas variables en base al conocimiento previo permite direccionar el trabajo hacia la obtención de complejos metálicos con propiedades cinéticas y termodinámicas que permitan la modulación de su actividad biológica [3]. En este sentido, varias familias de potenciales fármacos antiparasitarios a base de metales han sido reportados por el grupo de investigación que integro a lo largo de los años, con resultados muy prometedores [38-44]. Se utilizaron diferentes estrategias de diseño, como la coordinación de un ligando bioactivo con actividad antiparasitaria para mejorar su biodisponibilidad o lograr una sinergia metal – fármaco a través de un mecanismo de acción “*multitarget*”, y la coordinación de metales a compuestos intercaladores de ADN (de manera que esta biomolécula sea un blanco dentro del parásito). Entre los centros metálicos utilizados en investigaciones previas, se destaca el uso de renio (Re(I)), más específicamente formando un centro organometálico de tipo *fac*-{Re(CO)<sub>3</sub>}, el cual fue reportado por el grupo como una buena estrategia para el diseño de compuestos antitripanosomátidos [45].

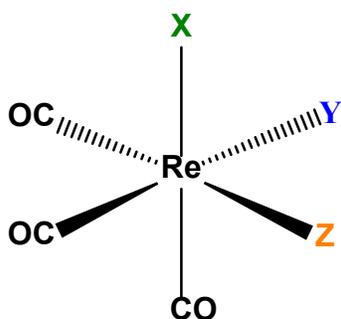
Cabe destacar que el renio(I) y sus compuestos han sido ampliamente estudiados en general por sus propiedades fotofísicas, fotoquímicas y catalíticas. Asimismo, los compuestos de renio(I) han sido utilizados en el campo de la medicina nuclear, en el desarrollo de metalofármacos radioterapéuticos [46]. Además, el centro organometálico *fac*-{Re(CO)<sub>3</sub>} ha sido explorado en el campo de desarrollo de agentes antitumorales [47-48], mostrando resultados muy prometedores [49-51].

### **1.5.1 El renio en compuestos organometálicos**

El estudio de la síntesis y caracterización de los tricarbonilos de renio comenzó a principios de la década de 1940, cuando Walter Hieber *et al.* estudiaron la sustitución de complejos de tipo

halógeno-Re-pentacarbonilo [52]. En particular, se sintetizó en este trabajo el compuesto  $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{BrPhen}]$ , como intermediario de uno de los complejos finales de estudio.

El centro organometálico  $\text{fac-}\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$  es muy estable incluso en presencia de disolventes coordinantes o en soluciones de ácido clorhídrico diluido (Figura 7). Únicamente el ácido sulfúrico y el ácido nítrico son capaces de oxidar dicho centro y, consecuentemente, descomponer los compuestos que lo contengan en su estructura [52].



**Figura 7.** Representación del centro  $\text{fac-}\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$  (X,Y,Z representan las posiciones de coordinación libres).

La principal característica estructural de los tricarbonilos de renio es la geometría de coordinación octaédrica del ion central que proporciona tres sitios de coordinación vacantes, además de los tres carbonilos coordinados en disposición facial. Teniendo en cuenta la clasificación de ácidos y bases duros y blandos, desarrollada en 1963 por Pearson, el centro tricarbonilo de  $\text{Re}(\text{I})$  se reconoce como un ácido de Lewis duro. En consecuencia, la estabilidad de los complejos de este centro metálico da como resultado estabilidades en el orden  $\text{N} > \text{S} > \text{O}$  para los átomos donantes de los ligandos. Por lo tanto, se encuentran con frecuencia en la literatura científica complejos tricarbonilo de  $\text{Re}(\text{I})$  con piridina, bipyridina y fenantrolina.

El centro organometálico  $\text{fac-}\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$  despertó particular interés en las investigaciones del grupo de Química Inorgánica Medicinal que integro, reportándose una serie de complejos con ligandos de tipo semicarbazona con actividad anti *T. cruzi* [45]. Asimismo, el grupo de investigadores notó que existía un gran impulso en la comunidad científica por desarrollar compuestos de tricarbonilo de renio(I) como compuestos antitumorales.

Se han reportado desarrollos con enfoque en compuestos antitumorales mostrando resultados prometedores desde que los primeros compuestos citotóxicos del centro  $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}$  fueron reportados en el año 2000 [53]. Diversos trabajos han surgido expandiendo la investigación de este tipo de aplicación [49-51]. Un trabajo publicado por Gasser *et al.* en 2014 resume la evaluación biológica de diferentes tricarbonilos de Re(I) [54].

Sin embargo, el uso de tricarbonilos de renio en el desarrollo de agentes antiparasitarios no ha sido prácticamente explorado. Esto dio lugar al problema central de investigación del presente trabajo de tesis, siendo que se trata un interesante centro organometálico, buen candidato para el desarrollo de compuestos antiparasitarios, dado que se ha descrito que los compuestos con actividad antitumoral suelen presentar también actividad antiparasitaria y viceversa.

### **1.5.2 La relación entre actividad antitumoral y actividad antiparasitaria**

Se ha encontrado una importante relación de actividad entre los compuestos antitumorales y los compuestos antiparasitarios. Tanto es así que incluso se ha llegado a estudiar para varios fármacos algo conocido como “*drug repositioning*”, una estrategia que permite que fármacos existentes y aprobados se reutilicen de manera innovadora para tratar otras enfermedades [55]. A modo de ejemplo, la Ivermectina, un reconocido fármaco antiparasitario, ha sido de particular interés como potencial antitumoral [56]. Algunos medicamentos antiparasitarios y antitumorales comparten el mismo blanco. La acción mutua de los fármacos antiparasitarios y anticancerígenos puede estar relacionada con blancos similares a nivel de las células tumorales y de los parásitos y/o a similitudes metabólicas entre estos tipos de células de rápido crecimiento [57-60]. Asimismo, se ha prestado particular atención a inhibidores de enzimas, tales como inhibidores de la proteína quinasa, como un medio para suprimir el crecimiento tumoral. Por ejemplo, se ha confirmado que una variedad de medicamentos dirigidos a las quinasas dependientes de ciclina (CDK), enzimas esenciales en la proliferación de células tumorales, que también han sido identificadas en parásitos, poseen efectos duales como antiparasitarios y anticancerígenos.

Adicionalmente, una serie de características que ocurren en las interacciones del parásito con el huésped en la enfermedad de Chagas, son muy similares a las características observadas en ciertos tipos de cáncer. El crecimiento de parásitos tripanosomátidos en su huésped y el de las

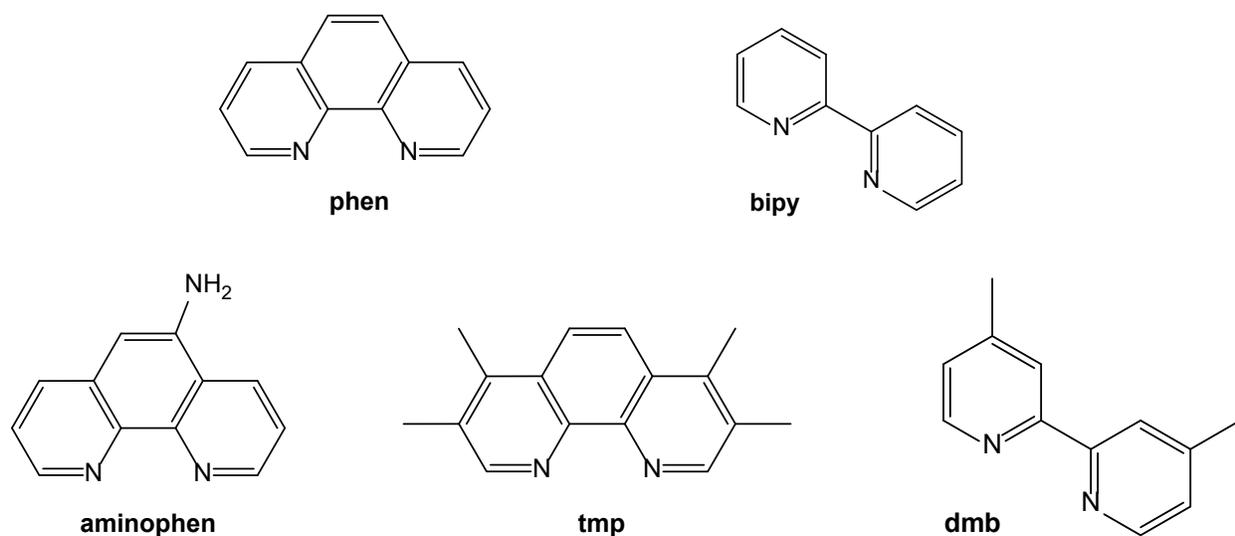
células tumorales muestra al menos dos características comunes que son: la capacidad mutua para la división celular rápida y algunas estrategias de evasión y defensa inmunológica [61]. Como ejemplos de este fenómeno, se pueden citar reportes de algunos fármacos antitumorales como Imatinib [62], antifolatos [63] y Cisplatino [64], que poseen también efectos antiparasitarios. Por otro lado, algunos antiparasitarios como Artemisinina [65] y Albendazol [66], poseen efectos anticancerígenos.

### 1.5.3 Ligandos bioactivos utilizados en este trabajo

Por los motivos mencionados anteriormente, el objetivo de este trabajo fue profundizar en el estudio de tricarbonilos de Re(I) para el desarrollo de potenciales agentes antiparasitarios, incorporando ligandos bioactivos de interés. Entre los posibles ligandos a utilizar se planteó el uso de la 1,10-fenantrolina y sus derivados. Estos son ligandos bidentados planos que ejercen efectos citotóxicos en variados sistemas biológicos y han mostrado actividad en parásitos [67-68]. Estudios sugieren que su efecto citotóxico está relacionado con su capacidad de intercalarse entre pares de bases del ADN [69-70]. La inclusión de estos ligandos puede favorecer la interacción intercalante de los nuevos compuestos con el ADN, resultando esta biomolécula un potencial blanco de acción. En este sentido, se seleccionaron 5 derivados de la 1-10-fenantrolina, tal como se pueden apreciar en la Tabla 1 y la Figura 8.

**Tabla 1. Derivados de la 1,10-fenantrolina utilizados como ligandos bioactivos**

<b>Código</b>	<b>Compuesto</b>
phen	1-10-fenantrolina
aminophen	5-amino-1-10-fenantrolina
tmp	4,3,7,8-tetrametil-1-10-fenantrolina
bipy	2,2'-bipiridina
dmb	4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina



**Figura 8. Estructuras de los ligandos derivados de la 1,10-fenantrolina utilizados.**

Considerando que el centro organometálico elegido posee la capacidad de formar tres enlaces de coordinación, y siendo que los derivados de la 1,10-fenantrolina son ligandos bidentados, puede coordinarse un ligando extra monodentado. En este sentido, existen varios azoles bioactivos que pueden actuar como un ligando monodentado, entre los cuales se encuentra el clotrimazol. Este compuesto ha demostrado una potente actividad antifúngica [71], actuando a nivel de la biosíntesis del ergosterol, principal esteroles en tripanosomátidos, esencial para proveer estructura y función a sus membranas y para la multiplicación del parásito [72]. Actúa inhibiendo la actividad de la enzima lanosterol 14 alfa-desmetilasa (CYP51) que convierte lanosterol en zymosterol, precursor del ergosterol [73].

La biosíntesis de esteroides en tripanosomátidos (Figura 9) difiere de la del huésped humano (donde el esteroles base es el colesterol), por lo que esta enzima es muy conveniente como blanco de acción [74-75]. En este trabajo se utiliza principalmente el clotrimazol como segundo ligando, siendo también sintetizado un complejo con su homólogo ketoconazol (Figura 10).

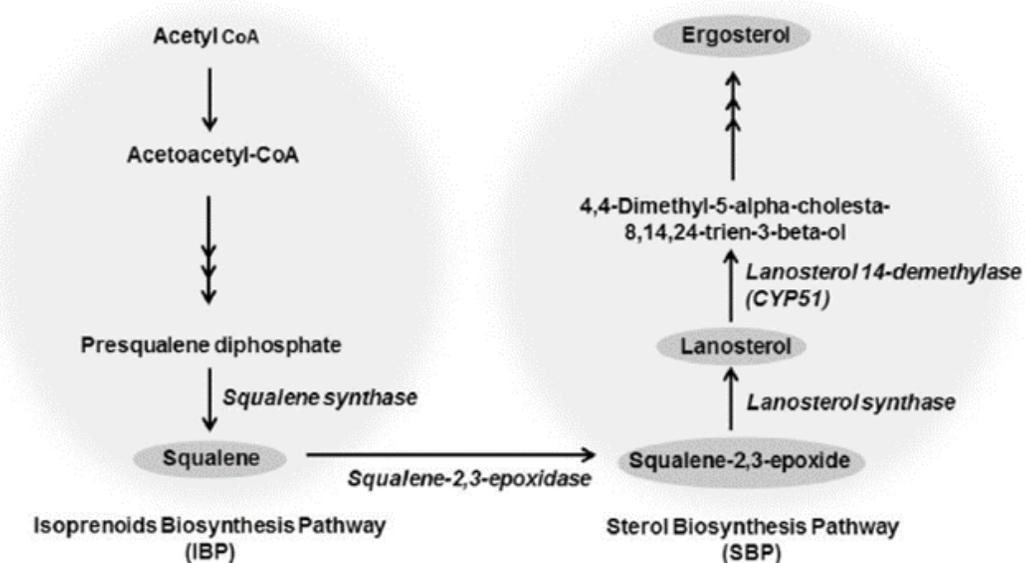


Figura 9. Esquema de la biosíntesis de esteroides en epimastigotas de *T. cruzi*. Fuente: Journal of Chromatography B 1061–1062 (2017) 225–232.

Uno de los primeros pasos en la ruta del lanosterol es la desmetilación del sistema de anillos en la posición C14. El paso de desmetilación utiliza una enzima monooxigenasa que contiene citocromo P450. Los azoles interfieren en la etapa de desmetilación de la vía. Los pares de electrones libres que existen en los átomos de nitrógeno de los azoles antifúngicos interactúan con el grupo hemo del citocromo P-450, interacción favorecida por las partes hidrofóbicas de la molécula, impidiendo la oxidación del grupo metilo y evitando así su remoción de la estructura [74]. La interacción con el citocromo P-450 también ocurre en los mamíferos, particularmente con enzimas sintetizadoras de esteroides, lo que resulta en cierta toxicidad. Sin embargo, a diferencia del caso anterior, la inhibición es competitiva con respecto al sustrato y esto puede explicar el nivel relativamente bajo de toxicidad observado en compuestos como ketoconazol [74].

La actividad de este tipo de ligandos en complejos metálicos antiparasitarios ya ha sido estudiada por Sánchez-Delgado *et al.* [76]. Los azoles clotrimazol y ketoconazol han sido reportados como parte de complejos con actividad biológica hacia diversas enfermedades, incluyendo actividad hacia *T. cruzi* [77-81].

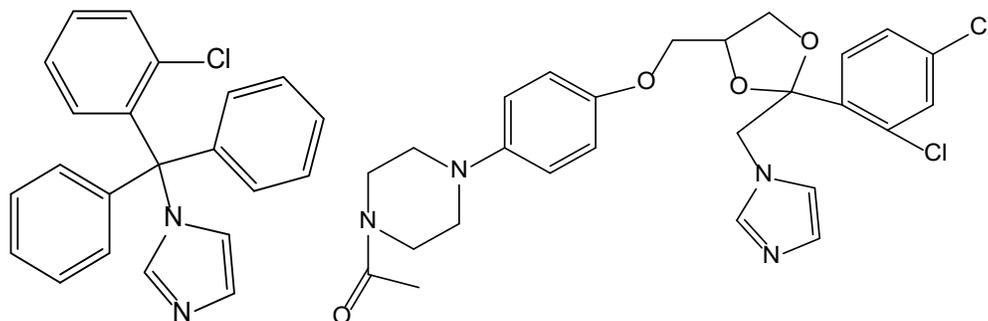


Figura 10. Azoles utilizados como ligandos. Izquierda clotrimazol. Derecha ketoconazol.

## 1.6 Rol de la Química Bioanalítica

Durante el desarrollo de nuevos potenciales fármacos, es de vital importancia poder caracterizar las estructuras, cuantificar los niveles en medios biológicos y evaluar las propiedades de los compuestos desarrollados en distintos entornos de interés. Para ello es clave la aplicación de herramientas de la Química Bioanalítica.

La Química Bioanalítica es una subdisciplina de la Química Analítica que implica la separación, detección, identificación y cuantificación de distintos analitos en muestras biológicas en diferentes entornos. A menudo implica el estudio de moléculas como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y fármacos. Algunas disciplinas como la Biología, la Bioquímica, la Medicina y la Toxicología, solo por nombrar algunas, se nutren con los avances de la Química Bioanalítica. En particular la Biología ha experimentado una revolución en las últimas dos décadas, pasando de una ciencia descriptiva de fenómenos a una ciencia mucho más basada en resultados de medición. Los estudios biológicos han enriquecido las Biociencias con muchas ideas nuevas que pueden resultar muy útiles en las investigaciones de la Química Bioanalítica, considerando que muchas de las técnicas utilizadas en la actualidad, tales como la cromatografía, los inmunoensayos y los análisis enzimáticos, tuvieron su origen en los laboratorios biológicos [82].

El desarrollo en materia de análisis bioanalítico tuvo un gran impulso a partir de la década de 1970, donde la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fue introducida y ganó rápidamente la aceptación inicial en los laboratorios bioanalíticos. La capacidad para analizar una

amplia variedad de compuestos estructuralmente diferentes sin la necesidad de la derivatización química ofreció ventajas significativas sobre la cromatografía de gases (GC), e incluso a su acople con espectrometría de masas (GC-MS). Con el tiempo, el desarrollo de esta técnica permitió la progresiva disminución de los tiempos de análisis y su acople con la espectrometría de masas (LC-MS), dotando a los químicos bioanalíticos con una herramienta de análisis altamente poderosa [83]. Esta técnica permite desarrollar métodos que pueden diferenciar a los compuestos en base a propiedades fisicoquímicas a través de su interacción con la fase estacionaria utilizada, siendo muy útil para investigación y desarrollo.

Actualmente, una de las incorporaciones más interesantes al repertorio de los químicos bioanalíticos es la aplicación de la espectroscopía Raman, la cual se ha convertido en una de las técnicas analíticas más poderosas en la investigación de biopolímeros [84]. En particular, la microespectroscopía Raman (es decir, la espectroscopía Raman acoplada a la microscopía) es un método poderoso para el estudio de células individuales, combinando alta especificidad molecular con una resolución en el rango submicrométrico. Esta técnica ha sido utilizada con éxito para determinar la ubicación de compuestos en células cancerígenas a través de los modos vibracionales característicos del centro organometálico *fac*-{Re(CO)<sub>3</sub>} [85], considerándose una herramienta poderosa para estudiar los posibles blancos de acción de complejos organometálicos, clave en estudios de tipo metalómico.

### **1.6.1 La metalómica**

El constante desarrollo del conocimiento de las bibliotecas genéticas de diversas especies ha conducido al desarrollo de las “ómicas”, disciplinas que apuntan al análisis de una determinada clase de componentes de un organismo vivo en su conjunto.

El genoma de un organismo contiene información que permite la predicción de la totalidad de las secuencias primarias de proteínas que pueden expresarse en dicho organismo. Esto es la base de la proteómica, el estudio del conjunto de proteínas producidas en una célula, tejido u organismo, su localización, estructura, estabilidad e interacciones biológicas [86]. Un tercio de las proteínas presenta o está asociada a un centro metálico, que cumple funciones clave en el organismo. La función de estas proteínas, denominadas metaloproteínas, depende de la

interacción con los metales asociados a ellas [87]. Por lo tanto, es de gran importancia el estudio de la presencia, caracterización y localización del conjunto de especies que contienen metales presentes en los organismos vivos, que se define como el metaloma (abarca también la presencia del metal libre), y de sus interacciones con el genoma, transcriptoma, proteoma y el metaboloma, lo cual requiere enfoques bioanalíticos dedicados a la detección, localización, identificación y cuantificación *in vivo*, análisis funcional *in vitro* y predicción *in silico* utilizando herramientas de la Bioinformática. De aquí surge el concepto de metalómica [86].

La metalómica es entonces el campo de estudio dedicado al estudio del metaloma y sus interacciones con el proteoma, genoma, metaboloma y biomoléculas de interés presentes en un determinado organismo [86]. Dentro de sus líneas de investigación se destacan los estudios de función, captación (*uptake*), transporte y almacenamiento de metales [87]. En este sentido, debido al éxito y proliferación de potenciales metalofármacos, la metalómica se ha convertido en una herramienta indispensable para el estudio del metabolismo de éstos, aportando métodos para evaluar la captación celular y las interacciones con moléculas biológicamente relevantes [86]. Esto es importante debido a que los metalofármacos, y cualquier fármaco en general, se encuentran con muchas barreras y obstáculos a superar para alcanzar una acción biológica determinada, y ser efectivos para un cierto fin. Esto incluye procesos de hidrólisis y/o interacciones con los componentes de la sangre por vía intravenosa, captación por células, tejidos malignos y otras entidades celulares (ej.: parásitos), cruzando membranas de forma pasiva, o a través de un sistema portador/receptor, o mediado por canales de transporte. Todo esto puede tener un efecto notable sobre el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de los fármacos. Además, dentro de una célula, las interacciones del fármaco con las biomoléculas pueden conducir a efectos secundarios graves o incluso a la desactivación, impidiendo la correcta interacción del fármaco con su blanco predestinado donde debería ejercer su potencial terapéutico [88]. Todas estas interacciones que pueden ocurrir *in vivo* hacen que sea difícil predecir los mecanismos de acción de los metalofármacos, entre ellos, sus blancos de acción. En este sentido, la metalómica busca brindar la información necesaria para poder esclarecer estos complejos mecanismos, haciendo uso de métodos analíticos cada vez más sensibles y específicos.

## 1.7 Objetivos

### 1.7.1 Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo de tesis fue sintetizar y caracterizar nuevos compuestos organometálicos con el centro *fac*-Re(I)(CO)<sub>3</sub> y realizar estudios fisicoquímicos y biológicos que permitieran evaluar su potencialidad como fármacos tripanosomicidas. Estos nuevos compuestos fueron diseñados racionalmente para que incluyeran en una misma molécula dos ligandos orgánicos bioactivos: uno perteneciente a la familia de derivados bidentados de la 1,10-fenantrolina y otro perteneciente a la familia de azoles monodentados. Asimismo, se pretendió incursionar en el estudio del mecanismo de acción más probable estudiando dos potenciales blancos de acción propios de los ligandos bioactivos seleccionados (ADN y lanosterol 14 alfa-desmetilasa) y de esta forma evaluar si existía correspondencia entre las actividades tripanosomicidas observadas. Para el compuesto más promisorio estos estudios se complementaron con estudios de metalómica en *T. cruzi* a efectos de determinar la incorporación y la distribución subcelular (asociación a biomoléculas relevantes) en el parásito. Para esto fue necesaria la optimización de dos metodologías que brindaron información complementaria: la espectrometría de emisión atómica por plasma de microondas y la microscopía Raman confocal. En suma, se buscó obtener nuevos compuestos con adecuado perfil biológico que pudieran ser considerados "*hits*" o líderes para el desarrollo de antiparasitarios organometálicos.

### 1.7.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar exhaustivamente en estado sólido y en solución nuevos compuestos organometálicos, tricarbonilos de Re(I) de fórmula *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(NN)(azol)](PF<sub>6</sub>), diseñados para que incluyan en una misma molécula dos ligandos orgánicos bioactivos pertenecientes uno a la familia de derivados bidentados de la 1,10-fenantrolina (NN) y otro a la familia de azoles monodentados (azol).
- Estudiar estabilidad, solubilidad y lipofilia de los compuestos metálicos obtenidos.
- Determinar el efecto de la coordinación de los ligandos bioactivos seleccionados al centro *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>] sobre la actividad y selectividad hacia *T. cruzi*.
- Incursionar en el estudio del mecanismo probable de acción de los compuestos.

- Incursionar en la metalómica de los compuestos estudiando la incorporación y distribución subcelular en *T. cruzi* para el compuesto más promisorio.
- Correlacionar la actividad biológica observada para los compuestos con los aspectos estructurales y las propiedades fisicoquímicas de los mismos.

## 1.8 Referencias

- [1] Orvig, C., Abrams, M.J. (1999). Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chemical Reviews*, 99(9), 2201-2204.
- [2] Yamada, K. (2013). Cobalt: its role in health and disease. *Interrelations Between Essential Metal Ions and Human Diseases*, 295–320.
- [3] Farrer, N.J., Sadler, P.J. (2011). Medicinal inorganic chemistry state of the art, new trends, and a vision of the future. *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, 422, 1-47.
- [4] Barrios, A.M., Cohen, S.M., Lim, M.H. (2013). Medicinal inorganic chemistry: A web themed issue. *Chemical Communications*, 49(53), 5910.
- [5] Sadler, P.J. (1991). Inorganic chemistry and drug design. *Advances in Inorganic Chemistry*, 36, 1–48.
- [6] Vieites, M., Otero, L., Gambino, D. (2014) Química inorgánica medicinal en ejemplos: desarrollo de fármacos metálicos. Anuario 2014 de ALDEQ (Asociación Latinoamericana de Enseñanza de la Química), XXIX, 199-205.
- [7] Mjos, K.D., Orvig, C. (2014). Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Reviews*, 114(8), 4540–4563.
- [8] Akbar, M.U., Ahmad, M.R., Shaheen, A., Mushtaq, S. (2016). A review on evaluation of technetium-99m labeled radiopharmaceuticals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 310(2), 477–493.
- [9] Komeda, S., Casini, A. (2012). Next-generation anticancer metallodrugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(3), 219–235.
- [10] Hanif, M., Hartinger, C.G. (2018). Anticancer metallodrugs: where is the next cisplatin? *Future Medicinal Chemistry*, 10(6), 615–617.

- [11] Anthony, E.J., Bolitho, E.M., Bridgewater, H.E., Carter, O.W.L., Donnelly, J.M., Imberti, C., Lant, E.C., Lermyte, F., Needham, R.J., Palau, M., Sadler, P.J., Shi, H., Wang, F., Zhang, W., Zhang, Z. (2020). Metallodrugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. *Chemical Science*, 11(48), 12888–12917.
- [12] Navarro, M., Visbal, G. (2015). Metal-based antiparasitic therapeutics. In: *Trace metals and infectious diseases*. MIT Press: Cambridge, UK.
- [13] Patra, M., Gasser, G., Metzler-Nolte, N. (2012). Small organometallic compounds as antibacterial agents. *Dalton Transactions*, 41(21), 6350.
- [14] Breinl, A., Todd, J.L. (1907). Atoxyl in the treatment of Trypanosomiasis. *British Medical Journal*, 1(2403), 132–134.
- [15] Haldar, A.K., Sen, P., Roy, S. (2011). Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular Biology International*, 2011, 571242.
- [16] Herwaldt, B.L., Berman, J.D. (1992). Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(3), 296–306.
- [17] Biot, C., Nosten, F., Fraise, L., Ter-Minassian, D., Khalife, J., Dive, D. (2011). The antimalarial ferroquine: from bench to clinic. *Parasite*, 18(3), 207–214.
- [18] Engels, D., Zhou, X.N. (2020). Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(10), 1–9.
- [19] [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/) (consultada 01/04/2022)
- [20] Murray, C.J.L., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A.D., Michaud, C., Abdalla, S. (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: A systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2197–2223.
- [21] <https://www.cdc.gov/parasites/chagas> (consultada 21/04/2022)
- [22] Lee, B.Y., Bacon, K.M., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infectious Diseases*, 13, 342–348.
- [23] Gambino, D. (2011). Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 255 (19-20), 2193–2203.

- [24] Gambino, D., Otero, L. (2012). Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. *Inorganica Chimica Acta*, 393, 103–114.
- [25] Benítez, J., Cavalcanti de Queiroz, A., Correia, I., Amaral Alves, M., Alexandre-Moreira, M. S., Barreiro, E. J., Moreira Lima, L., Varela, J., González, M., Cerecetto, H., Moreno, V., Costa Pessoa, J., Gambino, D. (2013). New oxidovanadium(IV) N-acylhydrazone complexes: promising antileishmanial and antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 20–27.
- [26] Machado, I., Fernández, M., Becco, L., Garat, B., Brissos, R. F., Zabarska, N., Gamez, P., Marques, F., Correia, I., Costa Pessoa, J., Gambino, D. (2014). New metal complexes of NNO tridentate ligands: Effect of metal center and co-ligand on biological activity. *Inorganica Chimica Acta*, 420, 39–46.
- [27] Scalese, G., Benítez, J., Rostán, S., Correia, I., Bradford, L., Vieites, M., Minini, L., Merlino, A., Coitiño, E.L., Birriel, E., Varela, J., Cerecetto, H., González, M., Costa Pessoa, J., Gambino, D. (2015). Expanding the family of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with salicylaldehyde semicarbazones and polypyridyl ligands showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 147, 116–125.
- [28] Scalese, G., Mosquillo, M.F., Rostán, S., Castiglioni, J., Alho, I., Pérez, L., Correia, I., Marques, F., Costa Pessoa, J., Gambino, D. (2017). Heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of 2-hydroxynaphthylaldimine and polypyridyl ligands against *Trypanosoma cruzi* and prostate cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 175, 154–166.
- [29] Rodríguez Arce, E., Machado, I., Rodríguez, B., Lapier, M., Zúñiga, M.C., Maya, J.D., Olea Azar, C., Otero, L., Gambino, D. (2017). Rhenium(I) tricarbonyl compounds of bioactive thiosemicarbazones: Synthesis, characterization, and activity against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 170, 125–133.
- [30] Gambino, D., Otero, L. (2018). Design of prospective antiparasitic metal-based compounds including selected organometallic cores. *Inorganica Chimica Acta*, 472, 58–75.
- [31] Scalese, G., Machado, I., Fontana, C., Risi, G., Salinas, G., Pérez-Díaz, L., Gambino, D. (2018). New heteroleptic oxidovanadium(V) complexes: synthesis, characterization, and biological

- evaluation as potential agents against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(8), 1265–1281.
- [32] Rivas, F., Medeiros, A., Rodríguez Arce, E., Comini, M., Ribeiro, C. M., Pavan, F.R., Gambino, D. (2018). New heterobimetallic ferrocenyl derivatives: Evaluation of their potential as prospective agents against trypanosomatid parasites and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 187, 73–84.
- [33] Viegas-Junior, C., Barreiro, E.J., Manssour Fraga, C.A. (2007). Molecular hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, 14(17), 1829–1852.
- [34] Gibson, D. (2019). Multi-action Pt(IV) anticancer agents; do we understand how they work? *Journal of Inorganic Biochemistry*, 191, 77–84.
- [35] Caballero, A.B., Salas, J.M., Sánchez-Moreno, M. (2014). Metal-based therapeutics for leishmaniasis. *Leishmaniasis - Trends in epidemiology, diagnosis, and treatment*, 20, 465–493.
- [36] Navarro, M., Visbal G. (2015). Metal-based antiparasitic therapeutics. In: *Trace metals and infectious diseases*. MIT Press: Cambridge, UK.
- [37] Gambino, D., Otero, L. (2019). Metal compounds in the development of antiparasitic agents; rational design from basic chemistry to the clinic. In: *Essential metals in medicine: Therapeutic use and toxicity of metal ions in the clinic*. De Gruyter: Berlin, Germany.
- [38] Gambino, D., Otero, L. (2018). Design of prospective antiparasitic metal-based compounds including selected organometallic cores. *Inorganica Chimica Acta*, 472, 58–75.
- [39] Costa Pessoa, J., Etcheverry, S., Gambino, D. (2015). Vanadium compounds in medicine. *Coordination Chemistry Reviews*, 301-302, 24–48.
- [40] Gambino, D., Otero, L. (2012) Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. *Inorganica Chimica Acta Special Issue Metals in Medicine*, 393, 103–114.
- [41] D. Gambino. (2011). Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 255, 2193– 2203.

- [42] Navarro, M., Gabbiani, C., Messori, L., Gambino, D. (2010) Metal based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis. Recent achievements and perspectives. *Drug Discovery Today*, 15, 1070–1078.
- [43] Gambino, D. (2010). Potential therapeutic applications of metal compounds directed towards hypoxic tissues. In: *Advances and current perspectives in Medicinal Inorganic Chemistry*. *Current Medicinal Chemistry*, 17(31), 3616–3631.
- [44] Beraldo, H., Gambino, D. (2004). The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. In: *Metal compounds in Medicinal Chemistry*. *Minireviews in Medicinal Chemistry*, 4(1), 31–40.
- [45] Machado, I., Fernández, S., Becco, L., Garat, B., Gancheff, J.S., Rey, A., Gambino, D. (2014). New *fac*-tricarbonyl rhenium(I) semicarbazone complexes: synthesis, characterization, and biological evaluation. *Journal of Coordination Chemistry*, 67, 1835–1850.
- [46] Abram, U., Alberto, R. (2006). Technetium and rhenium: coordination chemistry and nuclear medical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(8), 1486–1500.
- [47] Metzler-Nolte, N. (2001). Labeling of biomolecules for medicinal applications—bioorganometallic chemistry at its best. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(6), 1040–1043.
- [48] Lazarova, N., James, S., Babich, J., Zubieta, J. (2004). A convenient synthesis, chemical characterization and reactivity of  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]\text{Br}$ : The crystal and molecular structure of  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Br}]$ . *Inorganic Chemistry Communications*, 7(9), 1023–1026.
- [49] Konkankit, C.C., King, A.P., Knopf, K.M., Southard, T.L., Wilson, J.J. (2019). *In vivo* anticancer activity of a rhenium(I) tricarbonyl complex. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(5), 822–827.
- [50] Marker, S.C., MacMillan, S.N., Zipfel, W.R., Li, Z., Ford, P.C., Wilson, J.J. (2018). Photoactivated *in vitro* anticancer activity of rhenium(I) tricarbonyl complexes bearing water-soluble phosphines. *Inorganic chemistry*, 57(3), 1311–1331.
- [51] Capper, M.S., Rehkämper, M., Packman, H. (2020). Rhenium-based complexes and *in vivo* testing: A brief history. *ChemBioChem*, 21, 2111–2115.

- [52] Hieber, W., Fuchs, H. (1941). Über Metallcarbonyle. XXXIX. Aminsustituierte rheniumcarbonyle. Zeitschrift Für Anorganische Und Allgemeine Chemie, 248(3), 269–275.
- [53] Yan, Y.K., Cho, S.E., Shaffer, K.A., Rowell, J.E., Barnes, B.J., Hall, I.H. (2000). Cytotoxicity of rhenium(I) alkoxo and hydroxo carbonyl complexes in murine and human tumor cells. Die Pharmazie, 55(4), 307–313.
- [54] Leonidova, A., Gasser, G. (2014). Underestimated potential of organometallic rhenium complexes as anticancer agents. ACS Chemical Biology, 9(10), 2180–2193.
- [55] Li, Y.Q., Zheng, Z., Liu, Q.X., Lu, X., Zhou, D., Zhang, J., Zheng, H., Dai, J.G. (2021). Repositioning of antiparasitic drugs for tumor treatment. Frontiers in Oncology, 11, 670804.
- [56] Tang, M., Hu, X., Wang, Y., Yao, X., Zhang, W., Yu, C., Cheng, F., Li, J., Fang, Q. (2020). Ivermectin, a potential anticancer drug derived from an antiparasitic drug. Pharmacological Research, 163, 105207.
- [57] Dorosti, Z., Yousefi, M., Sharafi, S.M., Darani, H.Y. (2014). Mutual action of anticancer and antiparasitic drugs: Are there any shared targets? Future Oncology, 10(15), 2529–39.
- [58] Kinnamon, K.E., Steck, E.A., Rane, D.S. (1979). Activity of antitumor drugs against African trypanosomes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 15(2), 157–160.
- [59] Kondratskyi, A., Kondratska, K., Vanden Abeele, F., Gordienko, D., Dubois, C., Toillon, R.A., Slomianny, C., Lemiere, S., Delcourt, P., Dewailly, E., Skryma, R., Biot, C., Prevarskaya, N. (2017). Ferroquine, the next generation antimalarial drug, has antitumor activity. Scientific Reports, 7, 15896.
- [60] Farrell, N.P., Williamson, J., McLaren, D.J.M. (1984). Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes. Biochemical Pharmacology, 33(7), 961–971.
- [61] Ouaisi, A., Ouaisi, M. (2005). Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and Leishmania interaction with their host(s): Exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 53, 102–14.

- [62] Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., Matter, A. (2002). Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 1(7), 493–50.
- [63] Haller, D.G. (1997). Trimetrexate: experience with solid tumors. *Seminars in Oncology*, 24, 71–76.
- [64] Kaur, S., Sachdeva, H., Dhuria, S., Sharma, M., Kaur, T. (2010). Antileishmanial effect of cisplatin against murine visceral leishmaniasis. *Parasitology International*, 59(1), 62–69.
- [65] Woodrow, C., Haynes, R., Krishna, S. (2005). Artemisinins. *Postgraduate Medical Journal*, 81(952), 71–78.
- [66] Keiser, J., Utzinger, Jr. (2008). Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections. *JAMA*, 299(16), 1937–1948.
- [67] Zuma, A.A., da Silva, R.B., Garden, S.J., de Souza, W. (2021). *In vitro* study of the trypanocidal activity of anilinophenanthrolines against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology International*, 83, 102338.
- [68] Fernández, M., Varela, J., Correia, I., Birriel, E., Castiglioni, J., Moreno, V., Gambino, D. (2013). A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors. *Dalton Transactions*, 42(33), 11900.
- [69] Roy, S., Hagen, K.D., Maheswari, P. U., Lutz, M., Spek, A.L., Reedijk, J., van Wezel, G.P. (2008). Phenanthroline derivatives with improved selectivity as DNA-targeting anticancer or antimicrobial drugs. *ChemMedChem*, 3(9), 1427–1434.
- [70] Gil, A., Melle-Franco, M., Branchadell, V., Calhorda, M.J. (2015). How the intercalation of phenanthroline affects the structure, energetics, and bond properties of DNA base pairs: Theoretical study applied to adenine–thymine and guanine–cytosine tetramers. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(6), 2714–2728.
- [71] Crowley, P.D., Gallagher, H.C. (2014). Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present, and future. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), 611–617.
- [72] Vanden Bossche, H. (1990). Importance and role of sterols in fungal membranes. *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*, 135–157.

- [73] Kessler, R.L., Soares, M.J., Probst, C.M., Krieger, M.A. (2013). *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: Morphophysiological alterations leading to cell death. PLoS ONE, 8(1), e55497.
- [74] Barrett-Bee, K., Ryder, N. (1992). Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis inhibition. Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy, 410–436.
- [75] Santivañez-Veliz, M., Moreno-Viguri, E., Pérez-Silanes, S., Varela, J., Cerecetto, H., González, M., Lizarraga, E. (2017). Development, validation, and application of a GC–MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species in *Trypanosoma cruzi*. Journal of Chromatography B, 1061-1062, 225–232.
- [76] Sánchez-Delgado, R.A., Navarro, M., Lazard, K., Atencio, R., Capparelli, M., Vargas, F., Urbina, J.A., Bouillez, A., Noels, A.F., Masi, D. (1998). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. Synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. Inorganica Chimica Acta, 275–276, 528–540.
- [77] Martínez, A., Carreon, T., Iniguez, E., Anzellotti, A., Sánchez, A., Tyan, M., Sattler, A., Herrera, L., Maldonado, R.A., Sánchez-Delgado, R.A. (2012). Searching for new chemotherapies for tropical diseases: Ruthenium–clotrimazole complexes display high *in vitro* activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells. Journal of Medicinal Chemistry, 55(8), 3867–3877.
- [78] Iniguez, E., Sánchez, A., Vasquez, M. A., Martínez, A., Olivas, J., Sattler, A., Sánchez-Delgado, R.A., Maldonado, R.A. (2013). Metal–drug synergy: New ruthenium(II) complexes of ketoconazole are highly active against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and nontoxic to human or murine normal cells. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 18(7), 779–790.
- [79] Stevanović, N., Kljun, J., Aleksic, I., Bogojevic, S.S., Milivojevic, D., Veselinovic, A., Turel, I., Djuran, M., Nikodinovic-Runic, J. Glišić, B. (2022). Clinically used antifungal azoles as ligands for gold(III) complexes: The influence of Au(III) ion on the antimicrobial activity of the complex. Dalton Transactions, 51, 5322–5334.

- [80] Navarro, M., Colmenares, I., Correia, H., Hernández, A., Ching, Y., Millán, Y., Ojeda, L.E., Velásquez, M., Fraile, G. (2011). *In vitro* Activities of transition metal derivatives of ketoconazole and clotrimazole against a wild type of strain of *Saccharomyces cerevisiae* in absence or presence of human neutrophils. *Arzneimittelforschung*, 54(11), 752–756.
- [81] Simpson, P.V., Nagel, C., Bruhn, H., Schatzschneider, U. (2015). Antibacterial and antiparasitic activity of manganese(I) tricarbonyl complexes with ketoconazole, miconazole, and clotrimazole ligands. *Organometallics*, 34(15), 3809–3815.
- [82] Horvai, G., Worsfold, P., Karlberg, B., Andersen, J. (2011). Analytical chemistry and bioanalytical chemistry – A yet unshaped social relationship. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 422–424.
- [83] Powell, M.L., Unger, S.E. (2004). Bioanalytical methods: Challenges and opportunities in drug development. *Applications of Pharmacokinetic Principles in Drug Development*, 21–52.
- [84] Krafft, C. (2004). Bioanalytical applications of Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(1), 60–62.
- [85] Clède, S., Lambert, F., Sandt, C., Kascakova, S., Unger, M., Harté, E., Policar, C. (2013). Detection of an estrogen derivative in two breast cancer cell lines using a single core multimodal probe for imaging (SCoMPI) imaged by a panel of luminescent and vibrational techniques. *The Analyst*, 138(19), 5627.
- [86] Mounicou, S., Szpunar, J., Lobinski, R. (2009). Metallomics: The concept and methodology. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 1119.
- [87] Shi, W., Chance, M.R. (2008). Metallomics and metalloproteomics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(19), 3040–3048.
- [88] Groessl, M., Hartinger, C.G. (2012). Anticancer metallodrug research analytically painting the “omics” picture—current developments and future trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(6), 1791–1808.

# **CAPÍTULO 2**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Síntesis de complejos $[\text{Re(I)}(\text{CO})_3(\text{NN})(\text{AZOL})](\text{PF}_6)$

Las metodologías de síntesis se basaron en los procedimientos reportados por Maisuls *et al.* [1]. Se optimizaron las condiciones de tiempo de reacción, disolvente, método de separación y purificación. Para ello se probaron distintos tiempos de reflujo y distintas cantidades de disolvente, seleccionando los que dieron mejor resultado en cuanto a rendimiento. Se probó tanto separación por filtrado como centrifugado para aislar los sólidos obtenidos del medio de reacción, seleccionando finalmente el centrifugado por presentar menor pérdida de rendimiento. En cuanto a la purificación se realizaron lavados con distintos solventes, priorizando aquellos donde los compuestos presentaran una menor solubilidad.

La ruta general de síntesis se muestra a continuación en la Figura 11.

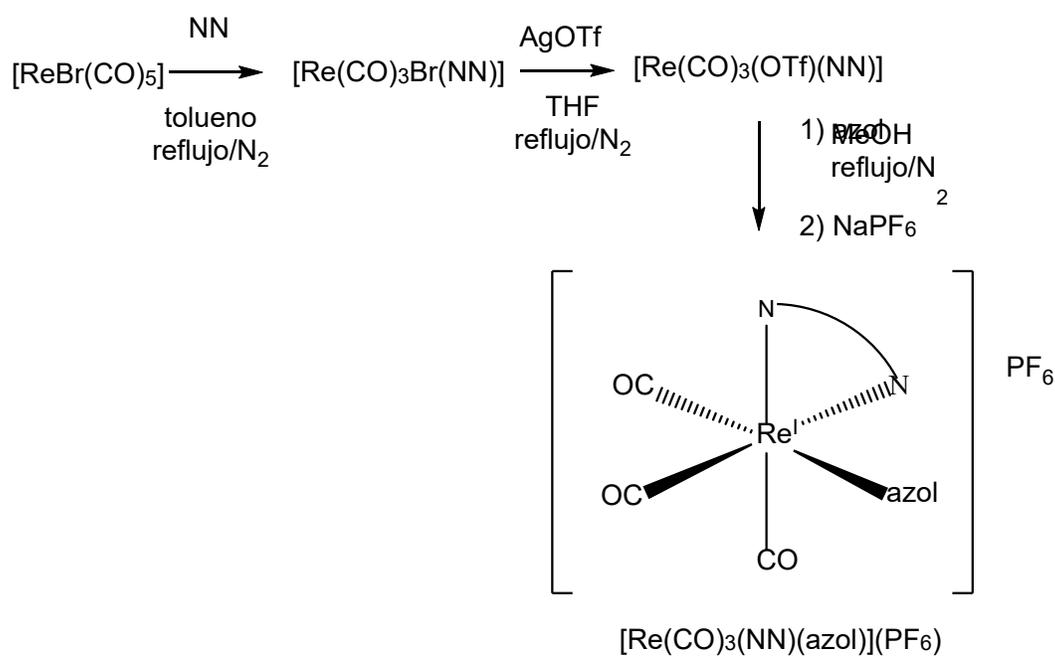


Figura 11. Ruta general de síntesis.

#### 2.1.1 Síntesis de $[\text{Re(I)}(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{CTZ})](\text{PF}_6)$

En un balón de dos bocas se colocan 50 mg (0,123 mmol) de  $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ . Se agrega al balón una cantidad equimolar de 1,10-fenantrolina (0,123 mmol/22 mg) y se agregan 6 mL de tolueno

(previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) bajo atmósfera inerte de N<sub>2</sub>, protegiendo al balón de la luz. Se calienta con agitación a reflujo por 24 horas.

Se suspende el sólido obtenido, se transfiere a tubos para centrifuga y se centrifuga por 4 min a 3000 rpm. Se separa el sobrenadante y se lava el sólido por duplicado con 2 mL de tolueno, se centrifuga por 5 min descartando los sobrenadantes. El sólido obtenido en el tubo se deja en desecador a vacío protegido de la luz por 24 horas.

El sólido seco se transfiere a un balón de dos bocas, se agrega cantidad equimolar de AgOTf (triflato de plata) (0.123 mmol/32 mg) y bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se agregan aproximadamente 7 mL de THF (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) protegiendo el sistema de la luz con papel aluminio. Se calienta a reflujo por 24 horas.

Se transfiere la solución con el precipitado de AgBr a un tubo para centrifuga y se centrifuga a 3000 rpm por 5 min. Se separa el sobrenadante, el sólido se lava por duplicado con 2 mL de THF y se centrifuga nuevamente. Ambos sobrenadantes se juntan en un balón y se evapora a presión reducida hasta sequedad para luego retomarse en 5 mL de metanol. Se centrifuga para eliminar cualquier residuo sólido remanente en suspensión. Posteriormente se agrega una cantidad equimolar, asumiendo 100 % de rendimiento, (0,123 mmol/43 mg) de clotrimazol disuelto en 5 mL de metanol al balón, se barbota N<sub>2</sub> y se calienta a reflujo por 24 horas, protegido de la luz.

Una vez finalizada la reacción, la solución se transfiere a un vaso de bohemia y se disminuye el volumen a 5 mL por evaporación. Se pesa una cantidad equimolar de NaPF<sub>6</sub> (0,123 mmol/21 mg) y agrega a la solución, la cual se agita con agitador magnético y protegido de la luz hasta la aparición de precipitado. El precipitado se separa por centrifugación, se realiza un lavado con 2 mL de etanol. El sólido se coloca protegido de la luz en desecador a vacío por 24 horas.

### **2.1.2 Síntesis de [Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>)**

En un balón de dos bocas se colocan 50 mg (0,123 mmol) de [Re(CO)<sub>5</sub>Br]. Se agrega al balón una cantidad equimolar de 5-amino-1,10-fenantrolina (0,123 mmol/24 mg) y se agregan 6 mL de tolueno (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) bajo atmósfera inerte de N<sub>2</sub>, protegiendo al balón de la luz. Se calienta con agitación a reflujo por 24 horas.

Se suspende el sólido obtenido, se transfiere a tubos para centrifuga y se centrifuga por 5 min a 3000 rpm. Se separa el sobrenadante y se lava el sólido por duplicado con 2 mL de tolueno, centrifugando por 5 min descartando los sobrenadantes y luego se continúa con un lavado con 1 mL de MeOH. Posteriormente, se centrifuga por 4 min y luego separa el sobrenadante. El sólido obtenido en el tubo se deja en desecador a vacío protegido de la luz por 24 horas.

El sólido obtenido se transfiere a un balón de dos bocas, se agrega cantidad equimolar de AgOTf (0.123 mmol/32 mg) y bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se agregan aproximadamente 7 mL de THF (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) cubriendo el sistema de la luz con papel aluminio. Se calienta a reflujo por 24 horas.

Se transfiere la solución con el precipitado de AgBr a un tubo para centrifuga y se centrifuga a 3000 rpm por 5 min. Se separa el sobrenadante, el sólido se lava por duplicado con 2 mL de THF y se centrifuga nuevamente. Ambos sobrenadantes se juntan en un balón y se evapora a presión reducida hasta sequedad para luego retomarse en 5 mL de metanol. Se centrifuga para eliminar cualquier residuo sólido remanente en suspensión. Se agrega una cantidad equimolar asumiendo 100% rendimiento (0,123 mmol/43 mg) de clotrimazol disuelto en 5 mL de metanol al balón, se barbota N<sub>2</sub> y se calienta a reflujo por 24 horas, protegido de la luz.

Una vez finalizada la reacción, la solución se transfiere a un vaso de bohemia y se disminuye el volumen a 5 mL por evaporación. Se pesa una cantidad equimolar de NaPF<sub>6</sub> (0,123 mmol/21 mg) y agrega a la solución, la cual se agita con agitador magnético y protegido de la luz hasta la aparición de precipitado. El precipitado se separa por centrifugación, se realiza un lavado con 2 mL de etanol. El sólido se coloca protegido de la luz en desecador a vacío por 24 horas.

### **2.1.3 Síntesis de [Re(I)(CO)<sub>3</sub>(bipy)(CTZ)](PF<sub>6</sub>)**

En un balón de dos bocas se colocan 50 mg (0,123 mmol) de [Re(CO)<sub>5</sub>Br]. Se agrega al balón una cantidad equimolar de 2,2'-bipiridina (0,123 mmol/19 mg) y se agregan 6 mL de tolueno (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) bajo atmósfera inerte de N<sub>2</sub>, protegiendo al balón de la luz. Se calienta con agitación a reflujo por 24 horas.

Se suspende el sólido obtenido, se transfiere a tubos para centrifuga y se centrifuga por 4 min a 3000 rpm. Se separa el sobrenadante y se lava el sólido por duplicado con 2 mL de tolueno, centrifugando por 5 min descartando los sobrenadantes. El sólido obtenido en el tubo se deja en desecador a vacío protegido de la luz por 24 horas.

El sólido obtenido se transfiere a un balón de dos bocas, se agrega cantidad equimolar de AgOTf (0.123 mmol/32 mg) y bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se agregan aproximadamente 7 mL de THF (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) cubriendo el sistema de la luz con papel aluminio. Se calienta a reflujo por 24 horas.

Se transfiere la solución con el precipitado de AgBr a un tubo para centrifuga y se centrifuga a 3000 rpm por 5 min. Se separa el sobrenadante, el sólido se lava por duplicado con 2 mL de THF y se centrifuga nuevamente. Ambos sobrenadantes se juntan en un balón y se evapora a presión reducida hasta sequedad para luego retomarse en 5 mL de metanol. Se centrifuga para eliminar cualquier residuo sólido remanente en suspensión. Posteriormente se agrega una cantidad equimolar asumiendo 100 % rendimiento (0,123 mmol/43 mg) de clotrimazol disuelto en 5 mL de metanol al balón, se barbota N<sub>2</sub> y se calienta a reflujo por 24 horas, protegido de la luz.

Una vez finalizada la reacción, la solución se transfiere a un vaso de bohemia y se disminuye el volumen a 5 mL por evaporación. Se pesa una cantidad equimolar de NaPF<sub>6</sub> (0,123 mmol/21 mg) y agrega a la solución, la cual se agita con agitador magnético y protegido de la luz hasta la aparición de precipitado. El precipitado se separa por centrifugación, se realiza un lavado con 2 ml de etanol. El sólido se coloca en desecador a vacío por 24 horas.

El sólido obtenido es purificado mediante columna de sílica gel, fase móvil MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20:80, se separan los primeros 20 mL de eluido y se evapora a presión reducida hasta sequedad para luego retomarse en 10 mL de metanol. Posteriormente se precipita por agregado gota a gota, a 10 mL de hexano en un vaso de bohemia con agitación constante. El sólido resultante se separa por centrifugación, se lava con 1 mL de hexano, luego con 1 mL de etanol absoluto y se coloca en desecador a vacío por 24 horas protegido de la luz.

#### 2.1.4 Síntesis de $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{tmp})(\text{CTZ})](\text{PF}_6)$

En un balón de dos bocas se colocan 50 mg (0,123 mmol) de  $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ . Se agrega al balón una cantidad equimolar de 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (0,123 mmol/29 mg) y se agregan 6 mL de tolueno (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) bajo atmósfera inerte de  $\text{N}_2$ , protegiendo al balón de la luz. Se calienta con agitación a reflujo por 24 horas.

Se suspende el sólido obtenido, se transfiere a tubos para centrifuga y se centrifuga por 4 min a 3000 rpm. Se separa el sobrenadante y se lava el sólido por duplicado con 2 mL de tolueno, centrifugando por 5 min descartando los sobrenadantes. El sólido obtenido en el tubo se deja en desecador a vacío protegido de la luz por 24 horas.

El sólido obtenido se transfiere a un balón de dos bocas, se agrega cantidad equimolar de  $\text{AgOTf}$  (0.123 mmol/32 mg) y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  se agregan aproximadamente 7 mL de THF (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) cubriendo el sistema de la luz con papel aluminio. Se calienta a reflujo por 24 horas.

Se transfiere la solución con el precipitado de  $\text{AgBr}$  a un tubo para centrifuga y se centrifuga a 3000 rpm por 5 min. Se separa el sobrenadante, el sólido se lava por duplicado con 2 mL de THF y se centrifuga nuevamente. Ambos sobrenadantes se juntan en un balón y se rotaevapora a sequedad para luego retomarse en 5 mL de metanol. Se centrifuga para eliminar cualquier residuo sólido remanente en suspensión. Posteriormente se agrega una cantidad equimolar asumiendo 100 % rendimiento (0,123 mmol/43 mg) de clotrimazol disuelto en 5 mL de metanol al balón, se barbota  $\text{N}_2$  y se calienta a reflujo por 24 horas, protegido de la luz.

Una vez finalizada la reacción, la solución se transfiere a un vaso de bohemia y se disminuye el volumen a 5 mL por evaporación. Se pesa una cantidad equimolar de  $\text{NaPF}_6$  (0,123 mmol/21 mg) y agrega a la solución, la cual se agita con agitador magnético y protegido de la luz hasta la aparición de precipitado. El precipitado se separa por centrifugación, se realiza un lavado con 2 mL de etanol. El sólido se coloca protegido de la luz en desecador a vacío por 24 horas.

### 2.1.5 Síntesis de $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{dmb})(\text{CTZ})](\text{PF}_6)$

En un balón de dos bocas se colocan 50 mg (0,123 mmol) de  $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ . Se agrega al balón una cantidad equimolar de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (0,123 mmol/23 mg) y se agregan 6 mL de tolueno (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) bajo atmósfera inerte de  $\text{N}_2$ , protegiendo al balón de la luz. Se calienta con agitación a reflujo por 24 horas.

Se suspende el sólido obtenido, se transfiere a tubos para centrifuga y se centrifuga por 4 min a 3000 rpm. Se separa el sobrenadante y se lava el sólido por duplicado con 2 mL de tolueno, centrifugando por 5 min descartando los sobrenadantes. El sólido obtenido en el tubo se deja en desecador a vacío protegido de la luz por 24 horas.

El sólido obtenido se transfiere a un balón de dos bocas, se agrega cantidad equimolar de  $\text{AgOTf}$  (0.123 mmol/32 mg y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  se agregan aproximadamente 7 mL de THF (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) cubriendo el sistema de la luz con papel aluminio. Se calienta a reflujo por 24 horas.

Se transfiere la solución con el precipitado de  $\text{AgBr}$  a un tubo para centrifuga y se centrifuga a 3000 rpm por 5 min. Se separa el sobrenadante, el sólido se lava por duplicado con 2 mL de THF y se centrifuga nuevamente. Ambos sobrenadantes se juntan en un balón y se rotaevapora a sequedad para luego retomarse en 5 mL de metanol. Se centrifuga para eliminar cualquier residuo sólido remanente en suspensión. Posteriormente se agrega una cantidad equimolar asumiendo 100 % rendimiento (0,123 mmol/43 mg) de clotrimazol disuelto en 5 mL de metanol al balón, se barbotan  $\text{N}_2$  y se calienta a reflujo por 24 horas, protegido de la luz.

Una vez finalizada la reacción, la solución se transfiere a un vaso de bohemia y se disminuye el volumen a 5 mL por evaporación. Se pesa una cantidad equimolar de  $\text{NaPF}_6$  (0,123 mmol/21 mg) y agrega a la solución, la cual se agita con agitador magnético y protegido de la luz hasta la aparición de precipitado. El precipitado se separa por centrifugación, se realiza un lavado con 2 mL de etanol. El sólido se coloca protegido de la luz en desecador a vacío por 24 horas.

### 2.1.6 Síntesis de $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{tmp})(\text{KTZ})](\text{PF}_6)$

En un balón de dos bocas se colocan 50 mg (0,123 mmol) de  $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ . Se agrega al balón una cantidad equimolar de 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (0,123 mmol/29 mg) y se agregan 6

mL de tolueno (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) bajo atmósfera inerte de  $N_2$ , protegiendo al balón de la luz. Se calienta con agitación a reflujo por 24 horas.

Se suspende el sólido obtenido, se transfiere a tubos para centrifuga y se centrifuga por 4 min a 3000 rpm. Se separa el sobrenadante y se lava el sólido por duplicado con 2 mL de tolueno, centrifugando por 5 min descartando los sobrenadantes. El sólido obtenido en el tubo se deja en desecador a vacío protegido de la luz por 24 horas.

El sólido obtenido se transfiere a un balón de dos bocas, se agrega cantidad equimolar de AgOTf (0.123 mmol/32 mg) y bajo atmósfera de  $N_2$  se agregan aproximadamente 7 mL de THF (previamente acondicionado barbotando nitrógeno de baja pureza) cubriendo el sistema de la luz con papel aluminio. Se calienta a reflujo por 24 horas.

Se transfiere la solución con el precipitado de AgBr a un tubo para centrifuga y se centrifuga a 3000 rpm por 5 min. Se separa el sobrenadante, el sólido se lava por duplicado con 2 mL de THF y se centrifuga nuevamente. Ambos sobrenadantes se juntan en un balón y se evapora a presión reducida hasta sequedad para luego retomarse en 5 mL de metanol. Se centrifuga para eliminar cualquier residuo sólido remanente en suspensión. Posteriormente se agrega una cantidad equimolar asumiendo 100 % rendimiento (0,123 mmol/65,4 mg) de ketoconazol disuelto en 10 mL de metanol al balón, se barbota  $N_2$  y se calienta a reflujo por 24 horas, protegido de la luz.

Una vez finalizada la reacción, la solución se transfiere a un vaso de bohemia y se disminuye el volumen a 5 mL por evaporación. Se pesa una cantidad equimolar de  $NaPF_6$  (0,123 mmol/21 mg) y agrega a la solución, la cual se agita con agitador magnético y protegido de la luz hasta la aparición de precipitado. El precipitado se separa por centrifugación, se realiza un lavado con 2 mL de etanol y 1 mL de éter. El sólido se coloca protegido de la luz en desecador a vacío por 24 horas.

## 2.2 Métodos de caracterización

### 2.2.1 Caracterización en estado sólido

#### 2.2.1.1 Análisis elemental

Los compuestos sintetizados se sometieron a ensayos de análisis elemental cuantitativo, para determinar el contenido porcentual de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre por análisis de combustión. Se utilizó un analizador Thermo Scientific Flash 2000 (Waltham, MA, EUA), perteneciente a la Facultad de Química, UdelaR. Las condiciones de trabajo se listan a continuación: flujo de oxígeno de 300 mL/min, flujo de carrier (He) 120 mL/min, tiempo de inyección de oxígeno 3 segundos, temperatura de combustión 950 °C, tiempo total de análisis 12 minutos.

Los resultados obtenidos se utilizaron para confirmar las fórmulas propuestas para cada compuesto y posteriormente para el chequeo de la pureza de éstos.

#### 2.2.1.2 Espectroscopía infrarroja

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo de los compuestos sintetizados en un rango entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$  en pastillas de KBr, utilizando un equipo Shimadzu IR Prestige-21 (Kioto, Japón), perteneciente a la Facultad de Química, UdelaR.

#### 2.2.1.3 Difracción de Rayos X

Se determinó la estructura del complejo *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) mediante la técnica de difracción de Rayos X. Los datos cristalográficos fueron adquiridos y las estructuras cristalinas fueron resueltas y refinadas por el Prof. Oscar Piro, Departamento de Física, Instituto IFLP (CONICET, CCT-La Plata), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Los monocristales adecuados para difracción de Rayos X fueron obtenidos por evaporación lenta de metanol. Los datos fueron adquiridos en un difractómetro Oxford Xcalibur Gemini, Eos CCD con radiación MoK $\alpha$  ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ). Se colectaron las intensidades de difracción, se integraron y escalaron utilizando el programa CrysAlisPro [2].

Los parámetros de la celda unitaria se obtuvieron mediante el refinamiento de mínimos cuadrados (basado en la configuración angular para todos los reflejos recopilados con intensidades superiores a siete veces la desviación estándar de los errores de medición)

utilizando CrysAlisPro. Los datos se corrigieron empíricamente para la absorción empleando el método *multi-scan* en CrysAlisPro. Las estructuras se resolvieron utilizando métodos directos con SHELXT [3] y el modelo molecular se refinó mediante ciclos de mínimos cuadrados de matriz completa con SHELXL asociados al programa SHELXT [4].

Se resolvieron dos polimorfos, uno cristalizado en un sistema triclinico y otro en un sistema monoclinico, con dos moléculas independientes por unidad asimétrica. El anión hexafluorofosfato en el polimorfo del sistema triclinico mostró un desorden severo que no pudo modelarse satisfactoriamente y, por lo tanto, se procedió con el refinamiento adicional de la parte ordenada de la estructura, *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)]<sup>+</sup>, utilizando un procedimiento de enmascaramiento del hexafluorofosfato descrito por Van der Sluis & Spek [5] e implementado en el programa SQUEEZE incluido en la serie de programas PLATON [6].

La mayoría de los átomos de hidrógeno de ambos polimorfos se detectaron en mapas de diferencia de densidades electrónicas de Fourier en fase con los átomos más pesados. Sin embargo, se modelaron sobre una base estereoquímica y se refinaron con el modelo de conducción.

## **2.2.2 Caracterización en solución**

### **2.2.2.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)**

Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN de los compuestos en DMSO-d<sub>6</sub>, se midieron en un equipo Bruker DPX-400 (Billerica, MA, EUA) perteneciente a Facultad de Química, Udelar. Se utilizó un B<sub>0</sub> de 400 MHz para los espectros de <sup>1</sup>H, y de 100 MHz para los espectros de <sup>13</sup>C.

### **2.2.2.2 Determinación de renio total mediante espectrometría de emisión atómica**

Las determinaciones de renio total se realizaron mediante espectrometría de emisión atómica por plasma de microondas (MP-AES) utilizando un espectrómetro Agilent 4210 (Santa Clara, CA, EUA) equipado con un nebulizador inerte One Neb con una cámara de pulverización ciclónica de vidrio de doble paso y una antorcha estándar. El espectrómetro utilizó nitrógeno generado en línea por un generador Agilent 4107 (Santa Clara, CA, EUA), que toma aire del medio ambiente a través de un compresor Dürr Technik KK70 TA-200 K (Bietigheim-Bissingen, Alemania). El flujo de gas de plasma se fijó en 20 L min<sup>-1</sup> y el caudal de gas auxiliar en 1,5 L min<sup>-1</sup>. Se aplicaron los

siguientes ajustes operativos: tiempo de captación de 70 s, tiempo de estabilización de plasma con aspiración de muestra de 15 s, tiempo de lectura de 3 s (por triplicado), tiempo de lavado de 20 s, longitud de onda 346,046 nm, posición de visualización -20, nebulizador caudal 0,8 L min<sup>-1</sup>. Se utilizó la corrección de fondo automática provista por el equipo.

Se prepararon curvas de calibración por dilución en serie de una solución de renio de 1000 mg L<sup>-1</sup> preparada a partir de perrenato de amonio (NH<sub>4</sub>ReO<sub>4</sub>) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) en 0,01 mol L<sup>-1</sup> de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) preparado a partir de HNO<sub>3</sub> concentrado (Merck, Darmstadt, Alemania). Para la evaluación de la veracidad y la precisión del método analítico se utilizó un material de referencia estándar (SRM) NIST 1643e (Gaithersburg, MD, EUA) de elementos traza en agua. Se utilizó agua ultrapura de 18,2 MΩcm de resistividad obtenida de un sistema de purificación de agua Millipore Direct Q3 UV (Bedford, MA, EUA). Todo el material de vidrio se descontaminó con HNO<sub>3</sub> 1,4 mol L<sup>-1</sup> y luego se enjuagó exhaustivamente con agua ultrapura.

Los compuestos de renio fueron previamente digeridos mediante digestión ácida asistida por microondas utilizando un digestor de microondas CEM Mars 6 (Matthews, NC, USA) provisto de 12 vasos Easy Prep Plus<sup>®</sup>. Para la preparación de muestras se pesaron exactamente 5,0 mg de muestra en cada vaso de reacción y se agregaron 10,0 mL de HNO<sub>3</sub> 3,5 mol L<sup>-1</sup>. El programa consistió en una rampa de 15 minutos hasta 200 °C y luego se mantuvo la temperatura constante por 10 min. La potencia se varió entre 400 y 1800 W, con una presión máxima de 3,4 MPa. Las soluciones obtenidas se utilizaron para las determinaciones analíticas mediante MP-AES luego de una dilución apropiada con agua ultrapura. Las muestras se realizaron por triplicado. También se realizaron blancos de reactivo.

### 2.2.2.3 Estudios de lipofilia mediante TLC

Se estudió la lipofilia mediante cromatografía en capa fina (TLC) de fase reversa utilizando como fase estacionaria placas de sílica modificada SIL RP-18 W/UV254 y como fase móvil una mezcla MeOH: DMF: bufer Tris-HCl (10 mM; pH 7,4) (75:20:5; v/v/v). Se prepararon soluciones *stock* de los ligandos libres y de los complejos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(bipy)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en MeOH, de los complejos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(dmb)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en THF y del compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en

DMSO. Se sembraron las placas de TLC con capilares de vidrio y el ensayo se realizó en una cámara cromatográfica cerrada. Las placas fueron secadas con aire caliente y reveladas mediante luz ultravioleta. Los valores de  $R_F$  fueron promediados de dos determinaciones y convertidos a  $R_M$  según la fórmula:  $R_M = \log_{10} [(1/R_F) - 1]$ .

#### **2.2.2.4 Estudios de lipofilia mediante HPLC**

Se estudió la lipofilia de los compuestos en solución mediante la técnica de cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), basados en los trabajos reportados por Du *et al.* [8] y Ayouni *et al.* [9]. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Shimadzu Prominence LC-20AT (Kioto, Japón), con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M20A (Kioto, Japón). Se utilizó como fase estacionaria una columna Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 de 4,6x250 mm y 5,0  $\mu\text{m}$ . Se empleó como fase móvil una mezcla MeOH: buffer fosfato 40 mM pH 7,4 (70:30) a un flujo constante de 0,8 mL  $\text{min}^{-1}$  en modo isocrático. Se estableció un volumen de inyección por corrida de 50  $\mu\text{L}$ . La longitud de onda de medida fue 254 nm.

Para la preparación de las disoluciones de trabajo se disolvió 1 mg de cada compuesto en 2 mL de DMSO. Las mismas fueron posteriormente filtradas utilizando filtros de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Se utilizó amarillo tartrazina para estimar el tiempo muerto ( $t_0$ ). Este compuesto se utiliza a menudo para estimar el  $t_0$  de la columna cromatográfica, ya que debido a sus propiedades polares presenta escasa afinidad por las fases estacionarias apolares tales como C8 [10].

#### **2.2.2.5 Estudios de lipofilia por coeficiente de reparto octanol – PBS**

La lipofilidad de los complejos se determinó experimentalmente en *batch*, como parte de los trabajos realizados durante la pasantía en el Instituto de Química para las Ciencias de la Vida de L'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris Chimie Paris Tech, Université PSL, Paris, Francia, bajo la supervisión del Prof. Dr. Gilles Gasser. Los complejos se disolvieron en una pequeña cantidad de DMSO y se incorporaron a una fase octanol – buffer PBS previamente saturados entre sí (2-3 h de agitación previa), y se agitaron durante la noche. Posteriormente, las muestras se dejaron asentar por 30 min y se centrifugaron 10 min a 6000 rpm. La capa orgánica se analizó por espectrometría UV-Vis en un espectrofotómetro multicelda Agilent Cary UV-Vis Multicell Peltier (Santa Clara, CA, EUA) y se determinó el coeficiente de partición ( $\log P$ ). Las curvas de

calibración correspondientes se realizaron agregando cantidades incrementales exactamente conocidas de compuesto en octanol y las mediadas instrumentales se efectuaron en el máximo de los espectros de absorción de cada compuesto.

## 2.3 Estudios de estabilidad en solución

### 2.3.1 Estabilidad en disolventes y en medios biológicos

Se estudió la estabilidad de los compuestos en solución mediante la técnica HPLC-DAD, basado en los protocolos y estudios de estabilidad reportados por Keller *et al.* [11], utilizando como disolventes: DMSO, DMSO: medio símil biológico (50:50), DMSO: Brain Heart Infusion (BHI) Agar complementado con suero bovino (Sigma-Aldrich) (50:50) y DMSO: suero fetal bovino (Sigma-Aldrich) (50:50). El medio símil biológico estuvo compuesto por:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g L<sup>-1</sup> y glucosa 2 g L<sup>-1</sup> [12]. La composición fue establecida de manera de simular la composición no proteica del medio de cultivo BHI en el cual se realizó el crecimiento de los parásitos. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Shimadzu Prominence LC-20AT (Kioto, Japón), con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M20A (Kioto, Japón). Se utilizó como fase estacionaria una columna Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 de 4,6x100 mm y 3,6  $\mu\text{m}$ , la cual fue termostatzada a 25 °C. Se empleó como fases móviles una disolución buffer fosfato 40 mM pH 7,4 (A) y MeOH (B) según el gradiente que se muestra en la Tabla 2, a un flujo constante de 1mL min<sup>-1</sup> [11,13]:

**Tabla 2. Gradiente utilizado para estudios de estabilidad en solución**

Tiempo (min)	% A	% B
0 – 3	100	0
3 – 6	100 – 75	0 – 25
6 – 9	75 – 66	25 – 34
9 – 20	66 – 0	34 – 100
20 – 27	0	100
27 – 30	0 – 100	100 – 0

Para la preparación de las disoluciones se disolvió 1 mg de compuesto en 2 mL de disolvente. Las mismas fueron luego filtradas utilizando filtros de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Se estableció un volumen de inyección por corrida de 50  $\mu\text{L}$ . La longitud de onda de medida fue 254 nm, obteniéndose un tiempo de retención de entre 22 y 24 minutos para los complejos en ambos disolventes. La estabilidad de los complejos fue estudiada en un período de 5 días, para DMSO y DMSO: medio símil biológico (50: 50) siendo las disoluciones medidas a  $t=0$  y  $t=5$  días, en iguales condiciones. De igual forma, se estudió la estabilidad en medio BHI suplementado en un período de un día, siendo las disoluciones medidas a  $t=0$  y  $t=1$  día. Adicionalmente, se obtuvieron los tiempos de retención de los ligandos libres, para lo cual se disolvió 1 mg de cada ligando en 2 mL de disolvente.

### 2.3.2 Estabilidad en plasma humano

Se estudió la estabilidad de los compuestos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(NN)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) en plasma humano siguiendo un procedimiento previamente reportado por Keller *et al.* [7], como parte de los trabajos realizados durante la pasantía en el Instituto de Química para las Ciencias de la Vida de L'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris Chimie Paris Tech, Université PSL, Paris, Francia, bajo la supervisión del Prof. Dr. Gilles Gasser.

Se prepararon soluciones *stock* 5,0 mM de los compuestos y cafeína (estándar interno) en DMSO y agua ultrapura, respectivamente. Se realizó una toma de 12,5  $\mu\text{L}$  de solución conteniendo el compuesto a estudiar y una toma de 12,5  $\mu\text{L}$  de solución de cafeína (a partir de las soluciones *stock* 5,0 mM), y se mezclaron con 975  $\mu\text{L}$  de plasma humano. La mezcla se incubó durante 0, 1, 3, 6 y 24 h a 37 °C con agitación suave y continua (700 rpm) protegida de la luz. Luego del tiempo de incubación, la solución de plasma se inactivó con 1 mL de metanol y 2 mL de diclorometano, y la mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. La capa orgánica se separó de la capa acuosa y el diclorometano se eliminó por medio de un evaporador rotatorio a presión reducida. El residuo se volvió a disolver en acetonitrilo y se filtró utilizando un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. La estabilidad de los compuestos se controló mediante HPLC-DAD. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, CA, EUA) con un detector de arreglo de diodos. Se

empleó una columna Agilent Pursuit XRs 5 C18 (4,6 x 250 mm, 5,0  $\mu\text{m}$ ) (Santa Clara, CA, EUA) como fase estacionaria. Se utilizó como fase móvil una mezcla de acetonitrilo: agua (90:10), a un flujo constante de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$  en modo isocrático. El volumen de inyección fue de 25  $\mu\text{L}$ . La longitud de onda de monitoreo fue de 270 nm.

## **2.4 Actividad biológica *in vitro* contra *T. cruzi***

### **2.4.1 Actividad en epimastigotas cepa Dm28c**

Se realizaron experimentos con la cepa *T. cruzi* Dm28c. Los ensayos fueron realizados por Gonzalo Scalese en la Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, UdelaR. Se obtuvo epimastigotas de cultivos axénicos, mantenidos en medio de infusión cerebro-corazón (BHI, Oxoid) suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado por calor (FBS, Capricorn), penicilina (100 unidades  $\text{mL}^{-1}$ ) y estreptomycin (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a 28°C y fueron cosechados durante la fase exponencial de crecimiento.

Se prepararon soluciones *stock* de los compuestos ensayados disolviendo los compuestos en DMSO. Las soluciones frescas se diluyeron en el medio de cultivo para obtener las diferentes concentraciones ensayadas y se usaron inmediatamente. A lo largo de los procedimientos experimentales, la concentración de DMSO nunca superó el 1 %, de forma de no generar toxicidad para los protozoos.

#### **2.4.1.1 Actividad contra *T. cruzi* y citotoxicidad inespecífica en células HeLa**

Se sembraron  $5 \times 10^6$  parásitos por pocillo en placas negras de 96 pocillos en medio RPMI con concentración creciente de compuestos durante 24 h. La viabilidad se probó utilizando alamar Blue™ (Thermo Fisher), donde la resazurina se reduce a resofurina, un compuesto de color rojo y altamente fluorescente. Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de alamar Blue™ a cada pocillo. Las placas negras se incubaron durante 3 horas a 28 °C. La fluorescencia (excitación 530 nm / emisión 590 nm) se midió en un espectrómetro Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode (Waltham, MA, EUA). Se utilizó Nifurtimox (Nfx) como compuesto anti-*T. cruzi* de referencia. Se registraron las curvas dosis-respuesta y se determinaron los valores de  $\text{IC}_{50}$  (50 % de concentración inhibitoria del

crecimiento) utilizando el software GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (La Jolla, CA, EUA). Se realizaron tres réplicas biológicas independientes [14].

Se usaron células HeLa como modelo de células de mamíferos para probar la citotoxicidad inespecífica. Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con FBS al 10 % inactivado por calor, penicilina (100 unidades mL<sup>-1</sup>) y estreptomycin (100 µg mL<sup>-1</sup>) a 37 °C en un incubador con CO<sub>2</sub> al 5 %. Para el mantenimiento, las células confluentes se lavaron con buffer PBS, se incubaron durante 3 min con tripsina-EDTA, se diluyeron y se volvieron a colocar en placas. Para el ensayo de citotoxicidad, se sembraron 10000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos en medio RPMI. Una vez adheridos a la placa, se añadieron los compuestos a la concentración indicada y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio), donde el MTT se reduce mediante deshidrogenasas de células metabólicamente activas, para generar equivalentes reductores como NADH y NADPH, lo que da como resultado la formación de un formazán púrpura intracelular que puede disolverse mediante la adición de DMSO. Brevemente, se agregaron 20 µL de MTT 5 mg mL<sup>-1</sup> a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de la incubación, se retiró el medio y se agregaron 100 µL de DMSO a cada pocillo. Las placas se mantuvieron en la oscuridad durante 15 min con agitación y se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro multicelda Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode. Cada ensayo se realizó por triplicado [14-17].

#### **2.4.2 Actividad en tripomastigotas cepa CL Brener**

Se realizaron ensayos con parásitos utilizando la cepa de *T. cruzi* CL Brener. Los ensayos fueron realizados por Gonzalo Scalese en la Sección Genómica Funcional, Facultad de Ciencias, UdelaR. Se cultivaron epimastigotas hasta que se observó una alta proporción de parásitos tripomastigotas metacíclicos (aproximadamente 21 días). Los cultivos ricos en tripomastigotas se incubaron durante la noche con una monocapa de células VERO en una relación parásito: célula de 10:1 en medio RPMI (Gibco™) a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. Los parásitos extracelulares se eliminaron al día siguiente aspirando el medio de cultivo celular, lavando la monocapa de células VERO tres veces con buffer PBS, seguido de la adición de medio

RPMI fresco. Los tripomastigotas que surgieron de las células VERO (6-7 días) se usaron para establecer nuevas infecciones de células VERO [18].

Los tripomastigotas derivados de células se obtuvieron del sobrenadante de células VERO infectadas recogidas 72 h después de la infección establecida con tripomastigotas surgidos de células. Se utilizaron células VERO (ATCC CCL81) como modelo de células de mamífero para probar la citotoxicidad inespecífica. Este linaje celular ha sido utilizado previamente como modelo eucariótico en infecciones por *T. cruzi* [19].

Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado por calor, penicilina (100 unidades mL<sup>-1</sup>) y estreptomycin (100 µg mL<sup>-1</sup>) a 37 °C en un incubador humidificado con CO<sub>2</sub> al 5 %. Para el mantenimiento, las células confluentes se lavaron con buffer PBS, se incubaron durante 3 min con tripsina-EDTA (Gibco™), se diluyeron y finalmente se volvieron a sembrar [15-17].

Los compuestos se disolvieron inicialmente en DMSO (solución *stock*). Las soluciones frescas se diluyeron en el medio de cultivo para obtener las diferentes concentraciones ensayadas. A lo largo de los procedimientos experimentales, la concentración de DMSO nunca superó el 1 %, de forma de no generar toxicidad para los parásitos [15-17].

#### **2.4.2.1 Actividad contra *T. cruzi* y citotoxicidad inespecífica en células VERO**

Para los ensayos de actividad se utilizó un procedimiento análogo al descrito en 2.4.1.1.

Para el ensayo de citotoxicidad inespecífica se utilizaron células VERO. Se sembraron 10000 células por pozo en una placa de 96 pozos en medio RPMI y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Una vez adheridas a la placa, las células se incubaron con las concentraciones de compuesto indicadas durante 24 h. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio bromuro), donde las células metabólicamente activas reducen el MTT para generar equivalentes reductores como NADH y NADPH, lo que da como resultado la formación de un formazán púrpura intracelular que puede solubilizarse mediante la adición de DMSO. Brevemente, se agregaron 20 µL de MTT 5 mg mL<sup>-1</sup> a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de la incubación, se eliminó el medio y las células se rompieron con 100 µL de DMSO. Las placas se mantuvieron durante 15 min con agitación y se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro

multicelda Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode (Waltham, MA, EUA). Cada ensayo se realizó por triplicado [14-17].

## 2.5 Estudio del mecanismo de acción

### 2.5.1 Inhibición de la biosíntesis de ergosterol

Para su evaluación se realizó un experimento sobre epimastigotas de *T. cruzi*, a una concentración de 90 millones de parásitos mL<sup>-1</sup>. El compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) se disolvió en DMSO y se agregó a concentraciones equivalentes a 1× y 10× el valor de IC<sub>50</sub> obtenido en los estudios de actividad *in vitro* contra *T. cruzi* (3,43 μM y 34,3 μM, respectivamente), y se incubó durante 4 horas a 28°C. La concentración de DMSO no superó el 0,4 % v/v en el medio de cultivo. De forma simultánea, se incubó un control de parásitos y un control positivo correspondiente a terbinafina, compuesto que actúa por inhibición enzimática en la biosíntesis de esteroides de membrana. La terbinafina se incubó a una concentración equivalente a su IC<sub>50</sub> en *T. cruzi* (44,7 μM). Concluido el tiempo de incubación, se efectuó la extracción de los esteroides de la membrana de los parásitos, entre ellos los esteroides de interés: ergosterol, lanosterol y el intermediario escualeno. Para ello, las muestras control, control positivo y parásitos tratados con el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos. Se suspendió el pellet en 1 mL de buffer fosfato (0,05 M, pH = 7,4) y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. El pellet resultante fue resuspendido en 1 mL de una mezcla cloroformo: metanol (2:1), y la suspensión resultante se mantuvo a 4 °C durante 12 horas. Luego se realizó la separación de fases del medio añadiendo 2 mL de una solución saturada de NaCl. Se extrajo la fase orgánica y se añadió 1 mL de cloroformo para extraer nuevamente esta fase, paso que se repitió dos veces para lograr una extracción cuantitativa [20-21]. La fase orgánica resultante se evaporó con corriente de N<sub>2</sub> y los residuos se retomaron en acetonitrilo para la posterior determinación mediante HPLC-DAD. El sistema cromatográfico utilizado consistió en una fase estacionaria C8 (250 × 4,6 mm, 5 μm) y fase móvil acetonitrilo 100 % a un flujo de 0,9 mL min<sup>-1</sup>, con detección a 210 nm [20,22].

### 2.5.2 Acoplamiento molecular e interacción con enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa

Se realizó un estudio de acoplamiento molecular e interacción con la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa, el cual fue llevado a cabo por el Dr. Nicolás Veiga del Área Química Inorgánica, Facultad de Química, UdelaR. La geometría de entrada para el complejo *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)]<sup>+</sup> se extrajo de la estructura cristalina de rayos X previamente resuelta. A partir de esta información, se construyó la geometría inicial para los otros compuestos que contienen CTZ modificando el ligando NN.

Se llevaron a cabo cálculos de acoplamiento molecular para obtener información sobre el mecanismo de acción de los complejos. Como hospedadores se emplearon ADN de timo de ternera (CT-DNA; PDB: 453D) y la lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa de *T. cruzi* (CYP51; PDB: 2wuz). Los detalles del experimento se pueden encontrar en el Anexo – Publicaciones.

### 2.5.3 Interacción con el ADN

Se emplearon experimentos de espectrometría de absorción electrónica para analizar la interacción directa de los complejos con el ADN [23]. Se evaluó la unión directa de los compuestos con CT-DNA monitoreando los cambios en los espectros electrónicos de los mismos mientras aumentaba la concentración de CT-DNA.

Las soluciones *stock* de CT-DNA se prepararon hidratando el ADN en buffer Tris-HCl (1 mg mL<sup>-1</sup>, ~ 2 mM nuc<sup>-1</sup>). La concentración de la solución *stock* se determinó por espectrofotometría UV usando el coeficiente de absorción molar  $\epsilon$  (260 nm) = 6600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> nuc<sup>-1</sup> [24]. Las soluciones *stock* de los compuestos se prepararon en DMSO a una concentración 5,0 mM y posteriormente se diluyeron en buffer Tris-HCl. Los experimentos se registraron en el rango de 240 a 340 nm en un espectrómetro Shimadzu UV-1603 usando una concentración fija de compuesto (10  $\mu$ M), mientras aumentaba la concentración de ADN (0 a 20  $\mu$ M) a temperatura ambiente. Después de cada adición, las soluciones se dejaron en equilibrio durante 5 minutos antes de registrar los espectros. [25]

## 2.6 Metalómica

### 2.6.1 Estudios de captación celular y distribución subcelular en *T. cruzi*

Se desarrolló y validó un método basado en espectrometría de emisión atómica asistido por plasma generado por microondas (MP-AES) para determinar la cantidad de compuesto de renio captado por el parásito (*uptake*).

Se determinó el porcentaje de captación del compuesto más promisorio, *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), tomando como punto de partida los trabajos previos del grupo de investigación [14]. Se cultivaron epimastigotas de la cepa CL Brener en una densidad de  $3 \times 10^6$  parásitos mL<sup>-1</sup> en medio de infusión BHI a 28°C y se incubaron con concentraciones del compuesto de renio correspondientes a 1× y 10× el valor de IC<sub>50</sub> determinado previamente en epimastigotas de *T. cruzi* (3,43 μmol L<sup>-1</sup> y 34,3 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente). Los parásitos fueron recogidos a las 4 h y 24 h luego de la incubación con el compuesto. Cada muestra ( $3 \times 10^6$  parásitos) se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante que contenía el compuesto no captado se separó del pellet de parásitos. Los parásitos en el pellet fueron lavados con buffer PBS 1× y resuspendidos en 500 μL de HNO<sub>3</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup> y sometidos a ultrasonido por 5 min en un baño ultrasónico Cole Parmer 8893 (Vernon Hills, IL, EUA) a 47 kHz para una solubilización óptima. Se diluyó el sobrenadante adecuadamente con HNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Ambas fracciones (pellet y sobrenadante) fueron analizadas por MP-AES. El porcentaje de captación de renio en los parásitos se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación: % entrada =  $P/(P + S)$ , donde “P” corresponde a los μg totales de renio en los parásitos (pellet), “S” corresponde a los μg de renio en el sobrenadante y “P + S” a los μg totales del metal incorporado en el experimento (sobrenadante + pellet). Se realizaron tres experimentos independientes para cada concentración en cada punto de tiempo analizado.

### 2.6.2 Microscopía RAMAN confocal

El estudio por microscopía Raman confocal fue realizado por el Dr. Ricardo Faccio en el Centro NanoMat, Instituto Polo Tecnológico de Pando de la Facultad de Química, UdelaR. Para obtener los espectros Raman en distintos puntos del parásito se utilizó un Microscopio Raman Confocal con AFM WITec modelo Alpha300RA (Dusseldorf, Alemania), a una longitud de onda de

excitación de 532 nm. La preparación de la muestra consistió en el depósito de una gota de una solución a diferentes concentraciones y tiempos de incubación, en un sustrato de silicio. La gota se secó bajo flujo de nitrógeno. Las imágenes Raman confocales se obtuvieron a partir de un ancho y altura de escaneo de 6  $\mu\text{m}$  x 6  $\mu\text{m}$  con cuadrículas de 35 puntos por línea y 35 líneas por imagen, con un tiempo de adquisición de 0,5 segundos para cada espectro. Se analizó una muestra control, luego cuatro situaciones diferentes con: dos concentraciones diferentes ( $1\times IC_{50}$  y  $10\times IC_{50}$ ) y dos tiempos de incubación (4 h y 24 h).

Se obtuvo un espectro del complejo más promisorio *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), en la región de 1000 a 3100  $\text{cm}^{-1}$ , y se trabajó integrando 4 regiones de interés con señales Raman en: 1580, 2100, 1437 y 2800/3000  $\text{cm}^{-1}$  que se atribuyen a ADN (estiramiento C=C de bases purinas), compuesto en estudio (estiramiento CO), deformaciones de metilos y metilenos (lípidos) y estiramiento C-H (lípidos), respectivamente [26-28].

## 2.7 Referencias

- [1] Maisuls, I., Wolcan, E., Piro, O.E., Etcheverría, G.A., Petroselli, G., Erra-Ballsels, R., Cabrerizo, F.M., Ruiz, G.T. (2015). Norharmane rhenium(i) polypyridyl complexes: Synthesis, structural and spectroscopic characterization. *Dalton Transactions*, 44(39), 17064–17074.
- [2] CrysAlisPro, Oxford Diffraction Ltd., Versión 1.171.33.48 (15-09-2009 CrysAlis171.NET).
- [3] Sheldrick, G.M. (2015). SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances*, 71(1), 3–8.
- [4] Sheldrick, G.M. (2007). A short history of SHELX. *Acta Crystallographica Section A – Foundations of Crystallography*, 64(1), 112–122.
- [5] Van der Sluis, P., Spek, A.L. (1990). BYPASS: An effective method for the refinement of crystal structures containing disordered solvent regions. *Acta Crystallographica Section A – Foundations of Crystallography*, 46(3), 194–201.
- [6] Spek, A.L. (1998). PLATON, A multipurpose crystallographic tool. Utrecht University: Utrecht, The Netherlands.

- [7] Keller, S., Ong, Y. C., Lin, Y., Cariou, K., Gasser, G. (2019). A tutorial for the assessment of the stability of organometallic complexes in biological media. *Journal of Organometallic Chemistry*, 906, 121059.
- [8] Du, C.M., Valko, K., Bevan, C., Reynolds, D., Abraham, M.H. (1998). Rapid gradient RP-HPLC method for lipophilicity determination: A solvation equation-based comparison with isocratic methods. *Analytical Chemistry*, 70(20), 4228–4234.
- [9] Ayouni, L., Cazorla, G., Chaillou, D., Herbreteau, B., Rudaz, S., Lantéri, P., Carrupt, P.A. (2005). Fast determination of lipophilicity by HPLC. *Chromatographia*, 62, 251–255.
- [10] Chen, J.C., Weber, S.G. (1982). Evaluation of reversed-phase column performance using p-hydroxybenzoate esters and tartrazine in water-enriched solvent. *Journal of Chromatography*, 248, 434–440.
- [11] Keller, S., Ong, Y. C., Lin, Y., Cariou, K., Gasser, G. (2020). A tutorial for the assessment of the stability of organometallic complexes in biological media. *Journal of Organometallic Chemistry*, 906, 121059.
- [12] Castelo, P.A., Alves, R., Rodrigues, F., Lyra, M.M., Pérez, A., Loureiro, C.V., Rozental, S., Lopes-Bezerra, L.M. (2010). L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells. *Medical Mycology*, 48, 687–695.
- [13] Rivas, F., Medeiros, A., Quiroga, C., Benítez, D., Comini, M., Rodríguez-Arce, E., Machado, I., Cerecetto, H., Gambino, D. (2021). New Pd–Fe ferrocenyl antiparasitic compounds with bioactive 8-hydroxyquinoline ligands: a comparative study with their Pt–Fe analogues. *Dalton Transactions*, 50, 1651–1665.
- [14] Scalese, G., Machado, I., Salinas, G., Pérez-Díaz, L., Gambino, D. (2021). Heteroleptic Oxidovanadium(V) Complexes with Activity against Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecules*. 26(17), 5375.
- [15] Scalese, G., Machado, I., Fontana, C., Risi, G., Salinas, G., Pérez-Díaz, L., Gambino, D. (2018). New heteroleptic oxidovanadium(V) complexes: synthesis, characterization, and biological evaluation as potential agents against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(8), 1265–1281.

- [16] Scalese, G., Machado, I., Correia, I., Pessoa, J. C., Bilbao, L., Perez, L., Gambino, D. (2019). Exploring oxidovanadium (IV) homoleptic complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives as prospective antitrypanosomal agents. *New Journal of Chemistry*, 43, 17756–17773.
- [17] Vieites, M., Smircich, P., Parajón-Costa, B., Rodríguez, J., Galaz, V., Olea-Azar, C., Otero, L., Aguirre, G., Cerecetto, H., González, M., Gómez-Barrio, A., Garat, B., Gambino, D. (2008). Potent *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(5), 723–735.
- [18] MacLean, L. M., Thomas, J., Lewis, M. D., Cotillo, I., Gray, D. W., De Rycker, M. (2018). Development of *Trypanosoma cruzi in vitro* assays to identify compounds suitable for progression in Chagas' disease drug discovery. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(7), e0006612.
- [19] Duran-Rehbein, G.A., Vargas-Zambrano, J.C., Cuéllar, A., Puerta, C.J., Gonzalez, J.M. (2014). Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. *Parasite*, 21(38), 1–9.
- [20] Gerpe, A., Álvarez, G., Benítez, D., Boiani, L., Quiroga, M., Hernández, P., Sortino, M., Zacchino, S., González, M., Cerecetto, H. (2009). 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 17(21), 7500–7509.
- [21] Santivañez-Veliz, M., Moreno-Viguri, E., Pérez-Silanes, S., Varela, J., Cerecetto, H., González, M., Lizarraga, E. (2017). Development, validation, and application of a GC–MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Chromatography B*, 1061-1062, 225–232.
- [22] Bavisetty, S.C.B., Narayan, B. (2015). An improved RP-HPLC method for simultaneous analyses of squalene and cholesterol especially in aquatic foods. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 6083–6089.
- [23] Maldonado, Y.D., Scalese, G., Manieri, K.F., Pavan, F.R., Aguirre Méndez, L.D., Gambino, D. (2022). New silver(I) phosphino complexes: Evaluation of their potential as prospective agents against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of inorganic biochemistry*, 227, 111683.

- [24] Barton, J.K., Goldberg, J.M., Kumar, C.V., Turro, N.J. (1986). Binding modes and base specificity of tris(phenanthroline)ruthenium(II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity. *Journal of the American Chemical Society*, 108(8), 2081–2088.
- [25] Santos, A.F., Ferreira, I.P., Pinheiro, C.B., Santos, V.G., Lopes, M.T.P., Teixeira, L.R., Rocha, W.R., Rodrigues, G.L., Beraldo, H. (2018). [Ag(L)NO<sub>3</sub>] Complexes with 2-Benzoylpyridine-Derived Hydrazones: Cytotoxic Activity and Interaction with Biomolecules. *ACS Omega*, 3(6), 7027–7035.
- [26] Naumann, D. (2001). FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectroscopy Reviews*, 36, 239–298.
- [27] Yu, C., Gestl, E., Eckert, K., Allara, D., Irudayaraj, J. (2006). Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy. *Cancer Detection and Prevention*, 30(5), 515–522.
- [28] Short, K.W., Carpenter, S., Frever, J.P., Mourante, J.R. (2005). Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures. *Biophysical Journal*, 88(6), 4274–4288.

# **CAPÍTULO 3**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Síntesis

Por medio de un procedimiento en etapas se sintetizaron seis compuestos con buena pureza (ausencia de señales no esperadas o pertenecientes a los ligandos libres en espectros de resonancia magnética nuclear y espectroscopía infrarroja) y rendimientos aceptables (en general cercanos o mayores al 40%). En un primer paso de síntesis, dos carbonilos del compuesto precursor  $[\text{ReBr}(\text{CO})_5]$  fueron sustituidos por el ligando NN bidentado bajo reflujo en tolueno, dando lugar a los precursores *fac*- $[\text{ReBr}(\text{CO})_3(\text{NN})]$ . En un segundo paso, se sustituyó el bromuro por triflato utilizando triflato de plata ( $\text{AgOTf}$ ) a reflujo en THF. El ligando triflato de los precursores *fac*- $[\text{Re}(\text{OTf})(\text{CO})_3(\text{NN})]$  se sustituyó luego por el azol en medio MeOH y se precipitó con hexafluorofosfato para dar el complejo esperado. A partir de los ligandos utilizados fueron sintetizados 6 complejos, listados a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3. Compuestos sintetizados durante el trabajo de tesis.

Compuesto	Fórmula	Sólido obtenido (masa (mg)/rendimiento (%))
<i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{CTZ})(\text{phen})](\text{PF}_6)$	$\text{C}_{37}\text{H}_{25}\text{ClF}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{PRe}$	Sólido amarillo (46,0/40)
<i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{CTZ})(\text{aminophen})](\text{PF}_6)$	$\text{C}_{37}\text{H}_{29}\text{ClF}_6\text{N}_5\text{O}_3\text{PRe}$	Sólido naranja (28,2/24)
<i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{CTZ})(\text{bipy})](\text{PF}_6)$	$\text{C}_{41}\text{H}_{33}\text{ClF}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{PRe}$	Sólido amarillo (47,0/42)
<i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{CTZ})(\text{dmb})](\text{PF}_6)$	$\text{C}_{35}\text{H}_{25}\text{ClF}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{PRe}$	Sólido amarillo (40,9/35)
<i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{CTZ})(\text{tmp})](\text{PF}_6)$	$\text{C}_{37}\text{H}_{29}\text{ClF}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{PRe}$	Sólido amarillo (43,0/53)
<i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{KTZ})(\text{tmp})](\text{PF}_6)$	$\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_7\text{PRe}$	Sólido amarillo (85,0/69)

Dichos compuestos fueron caracterizados completamente mediante diversas técnicas de caracterización y sometidos a ensayos para la determinación de propiedades fisicoquímicas de interés biológico, así como a ensayos de actividad en *T. cruzi* y citotoxicidad en células mamíferas. También los precursores *fac*- $[\text{ReBr}(\text{CO})_3(\text{NN})]$  fueron caracterizados por las mismas técnicas. Complementariamente se realizaron estudios metalómicos, donde se evaluó la captación y distribución del compuesto más promisorio dentro del parásito. Finalmente, se estudiaron en forma experimental y teórica, probables mecanismos de acción y posibles blancos de acción de los compuestos obtenidos.

## 3.2 Caracterización en estado sólido

### 3.2.1 Análisis elemental

Las fórmulas propuestas para cada uno de los complejos sintetizados fueron confirmadas mediante análisis elemental de carbono, nitrógeno e hidrógeno.

Inicialmente, los análisis de C, N y H no mostraron una concordancia adecuada con las fórmulas propuestas. Al tratar de explicar este fenómeno, se presumió que esto podía deberse a que los complejos no se quemaban completamente en las condiciones comunes del analizador elemental, ya que los compuestos orgánicos y organometálicos difícilmente degradables han sido tradicionalmente problemáticos a la hora de realizar determinaciones mediante análisis elemental. Por este motivo, el método tuvo que modificarse agregando pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) como catalizador a la muestra para permitir una descomposición completa y un adecuado análisis cuantitativo [1]. El mismo se añadió directamente al pocillo de estaño que contenía el compuesto a ensayar en una relación 1:3.

Los resultados del análisis elemental se ajustaron a las fórmulas propuestas para los nuevos complejos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(NN)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y para *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>), tal como se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4. Composiciones porcentuales teóricas y valores experimentales obtenidos a partir del análisis elemental.**

Compuesto	Composición porcentual teórica	Valor experimental
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(phen)](PF <sub>6</sub> )	C <sub>37</sub> H <sub>25</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Pre: C, 47,26; H, 2,68; N, 5,96 %	C, 46,95; H, 2,54; N, 6,04 %
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(aminophen)](PF <sub>6</sub> )	C <sub>37</sub> H <sub>29</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Pre: C, 46,52; H, 2,74; N, 7,33 %	C, 46,71; H, 2,47; N, 7,08 %
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(bipy)](PF <sub>6</sub> )	C <sub>35</sub> H <sub>25</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Pre: C, 45,88; H, 2,75; N, 6,11 %	C, 46,22; H, 2,80; N, 6,13 %
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(dmb)](PF <sub>6</sub> )	C <sub>37</sub> H <sub>29</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Pre: C, 47,06; H, 3,10; N, 5,93 %	C, 46,79; H, 3,68; N, 5,87 %
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(tmp)](PF <sub>6</sub> )	C <sub>41</sub> H <sub>33</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Pre: C, 49,92; H, 3,34; N, 5,62 %	C, 49,33; H, 3,70; N, 5,59 %
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (KTZ)(tmp)](PF <sub>6</sub> )	C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> Pre: C, 45,69; H, 3,75; N, 7,10 %	C, 45,12; H, 3,71; N, 6,97 %

### 3.2.2 Análisis mediante espectroscopía infrarroja

Mediante espectroscopía FTIR, se pudieron identificar en los complejos las bandas de vibración intensas características de los grupos funcionales CO unidos al centro metálico, presentes entre 1900 y 2030  $\text{cm}^{-1}$ . Éstas son características de los complejos monoméricos pseudo-octaédricos conteniendo el centro  $fac\text{-}\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^+$ , tal como se pueden observar en reportes previos de la literatura [2-3]. El centro  $fac\text{-}\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^+$  presenta tres bandas o dos bandas con un hombro, tal como se puede observar en la Figura 12. Éstas permitieron identificar fácilmente la presencia del centro metálico y, como se puede observar en el ejemplo representado en la Figura 13 (los restantes se encuentran en las Figuras A1 a A5 del Anexo), dichas bandas solo aparecieron en los complejos y no en los ligandos libres. Adicionalmente, los complejos presentaron bandas de estiramiento en la región comprendida entre 1400 y 1650  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a los enlaces C=N y C=C [4-8], que sufrieron leves desplazamientos con respecto a los observados en los ligandos libres, debido a la influencia de la formación del enlace de coordinación con el centro metálico. También se identificaron las fuertes bandas de estiramiento  $\nu(\text{P-F})$  y flexión  $\delta(\text{F-P-F})$  del contraión  $\text{PF}_6$  alrededor de 840 y 560  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente [9].

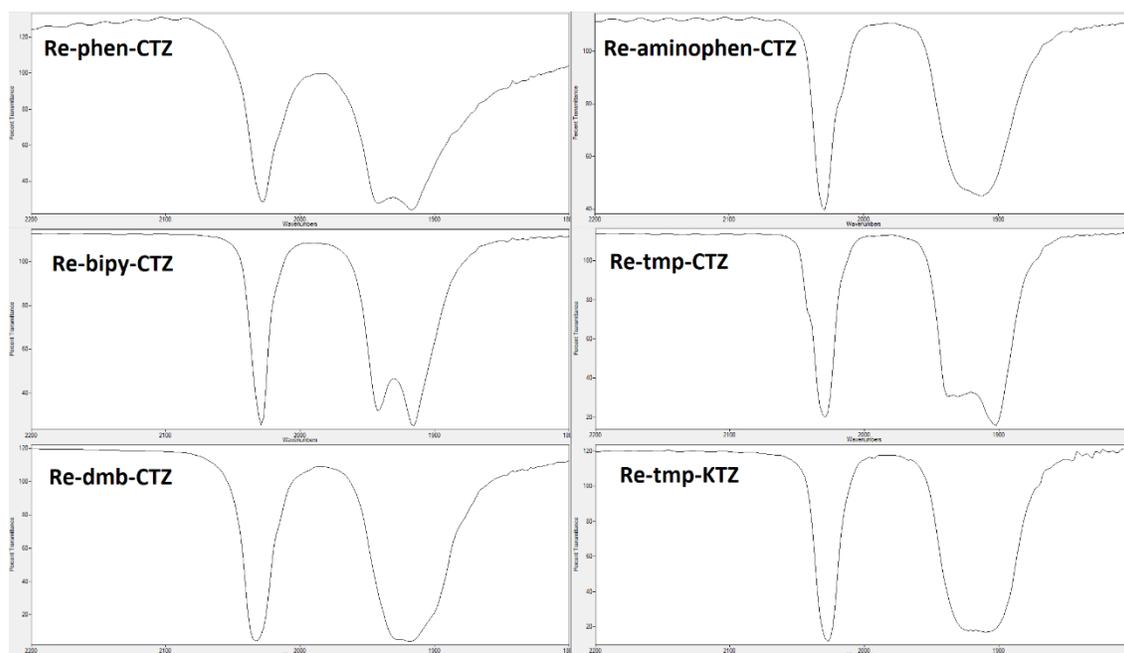


Figura 12. Espectros IR en el rango 1800 - 2200  $\text{cm}^{-1}$  incluyendo las bandas correspondientes a los estiramientos C-O de los carbonilos del centro metálico.

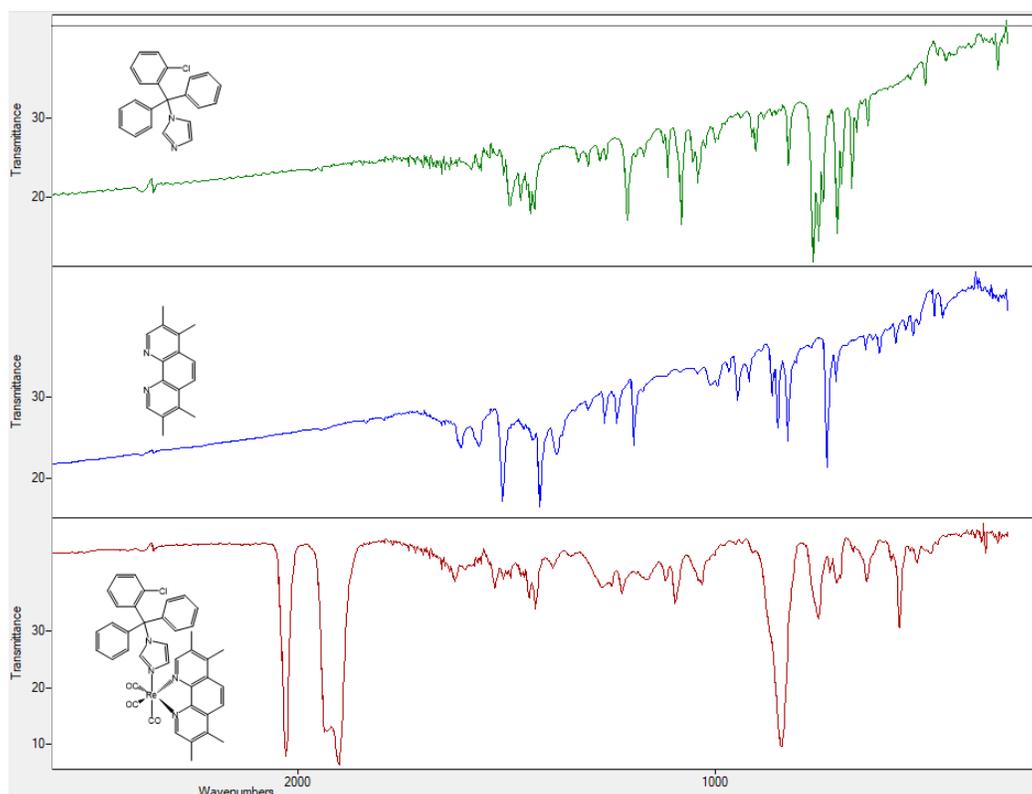


Figura 13. Comparación del espectro IR del complejo *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(CTZ)(tmp)](PF<sub>6</sub>) y sus ligandos libres tmp y CTZ, a modo de ejemplo.

La asignación de las bandas IR para cada uno de los complejos se resume a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Asignación tentativa de bandas del espectro IR de los compuestos.

Compuesto	Bandas (cm <sup>-1</sup> )
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(phen)](PF <sub>6</sub> )	2030, 1943, 1915 ν(C≡O), 1586, 1561, 1495, 1444, 1429 ν(C=N), ν(C=C), 838 ν(P-F), 557 δ(F-P-F)
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(aminophen)](PF <sub>6</sub> )	2030, 1915 ν(C≡O)*, 1597, 1560, 1493, 1448, 1432 ν(C=N), ν(C=C), 843 ν(P-F), 558 δ(F-P-F)
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(bipy)](PF <sub>6</sub> )	2030, 1941, 1917 ν(C≡O), 1604, 1560, 1491, 1444, 1433 ν(C=N), ν(C=C), 840 ν(P-F), 557 δ(F-P-F)
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(dmb)](PF <sub>6</sub> )	2035, 1919 ν(C≡O)*, 1598, 1560, 1487, 1448, 1433 ν(C=N), ν(C=C), 840 ν(P-F), 557 δ(F-P-F)
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (CTZ)(tmp)](PF <sub>6</sub> )	2030, 1930, 1902 ν(C≡O), 1599, 1560, 1491, 1447, 1431 ν(C=N), ν(C=C), 842 ν(P-F), 558 δ(F-P-F)
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (KTZ)(tmp)](PF <sub>6</sub> )	2031, 1914 ν(C≡O)*, 1585, 1561, 1491, 1449, 1432 ν(C=N), ν(C=C), 844 ν(P-F), 557 δ(F-P-F)

\*bandas solapadas.

### 3.2.3 Difracción de Rayos X

Se determinó la estructura cristalina del complejo *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en el Departamento de Física, Instituto IFLP (CONICET, CCT - La Plata), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, por parte del Prof. Oscar Piro.

Se realizaron ensayos para determinar la estructura cristalina a partir de dos cristalizaciones del complejo *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) mediante métodos de difracción de rayos X. Uno de ellos, cristaliza en el grupo espacial triclinico P-1 con  $a = 11,3683(3)$ ,  $b = 12,1500(3)$ ,  $c = 14,2904(4)$  Å,  $\alpha = 110,797(2)$ ,  $\beta = 99,919(2)$ ,  $\gamma = 103,574(2)^\circ$  y  $Z = 2$  moléculas por celda unitaria y la otra en el grupo espacial monoclinico P2(1)/n con  $a = 19,2076(6)$ ,  $b = 11,9631(3)$ ,  $c = 32,482(1)$  Å,  $\beta = 104,958(4)^\circ$  y dos moléculas (confórmeros) independientes por unidad asimétrica ( $Z = 8$ ). La información detallada se puede observar en la Tabla 6.

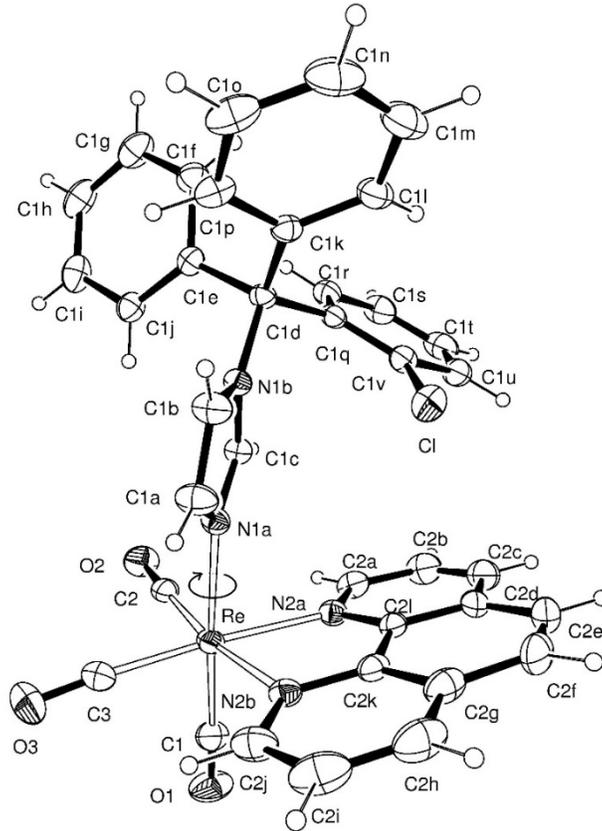
El ion Re(I) está en un entorno octaédrico, con tres grupos carbonilo (CO) en forma facial, una molécula de 1,10-fenantrolina que actúa como ligando bidentado y una molécula de clotrimazol que actúa como ligando monodentado a través de un átomo de N del imidazol. Los complejos en estado sólido son confórmeros entre sí y pueden coincidir casi por completo a través de la rotación del ligando CTZ alrededor del enlace Re-N.

En la Figura 14 se puede observar la representación del complejo *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en su forma polimórfica triclinica de su sal de hexafluorofosfato que muestra los elipsoides de desplazamiento de los átomos con un nivel de probabilidad del 30%. No se incluyen los átomos de hidrógeno y el contraion hexafluorofosfato. Las interacciones ligando-metal se indican mediante enlaces representados sin relleno. La figura muestra la rotación del ligando orgánico alrededor del enlace Re-N que hace que el complejo triclinico coincida casi a la perfección con los confórmeros del complejo observado en el polimorfo monoclinico.

Tabla 6. Datos cristalográficos y refinamiento de la estructura para los polimorfos triclinico y monoclinico del compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>).

Polimorfo	Triclinico	Monoclinico
Fórmula empírica	C <sub>37</sub> H <sub>25</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Pre	C <sub>37</sub> H <sub>25</sub> ClF <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Pre
Peso fórmula	940,23	940,23
Temperatura (K)	297(2)	297(2)
Longitud de onda (Å)	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	Triclinico	Monoclinico
Grupo espacial	P-1	P2 <sub>1</sub> /n
Dimensiones de celda unidad		
a (Å)	11,3683(3)	19,2076(6)
b (Å)	12,1500(3)	11,9631(3)
c (Å)	14,2904(4)	32,482(1)
α (°)	110,797(2)	90,000
β (°)	99,919(2)	104,958(4)
γ (°)	103,574(2)	90,000
Volumen (Å <sup>3</sup> )	1721,30(8)	7211,0(4)
Z, densidad calc. (Mg/m <sup>3</sup> )	2, 1,814	8, 1,732
Coef. de absorción (mm <sup>-1</sup> )	3,731	3,563
F(000)	920	3680
Tamaño de cristal (mm <sup>3</sup> )	0,440 x 0,407 x 0,200	0,472 x 0,252 x 0,143
Rango de colección de datos en θ- (°)	3,363 a 29,023	2,979 a 26,000
Índices de Miller	-15 ≤ h ≤ 15, -16 ≤ k ≤ 15, -17 ≤ l ≤ 17	-23 ≤ h ≤ 13, -14 ≤ k ≤ 14, -33 ≤ l ≤ 39
Reflexiones colectadas	16130	36391
Reflexiones independientes	7486 [R(int) = 0,0316]	14104 [R(int) = 0,0343]
Reflexiones observadas [I > 2σ(I)]	6540	10770
Compleitud (%)	99,7 (to θ = 25,242°)	99,8 (to θ = 25,242°)
Método de refinamiento	Full-matrix mínimos cuadrados F <sup>2</sup>	Full-matrix mínimos cuadrados F <sup>2</sup>
Datos / restricciones / parámetros	7486 / 0 / 415	14104 / 0 / 955
Bondad de ajuste en F <sup>2</sup> (GooF)	1,031	1,138
Índices R finales <sup>a</sup> [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0328, wR2 = 0,0773	R1 = 0,0403, wR2 = 0,0728
Índices R (total de datos)	R1 = 0,0411, wR2 = 0,0815	R1 = 0,0631, wR2 = 0,0855
Mayor diferencia entre pico y hueco (peak & hole) (e, Å <sup>-3</sup> )	2,263 y -0,877	0,996 y -1,924

$$^a R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|, wR_2 = [\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2 / \sum w(|F_o|^2)]^{1/2}$$



**Figura 14. Representación del complejo  $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{phen})(\text{CTZ})](\text{PF}_6)$  en su forma polimórfica triclínica de su sal de hexafluorofosfato.**

Las distancias y los ángulos de enlace dentro del complejo triclínico y los dos complejos independientes en la fase cristalina monoclinica se enumeran en las Tablas 7 y 8, respectivamente. Los tres complejos son confómeros entre sí, y solo difieren principalmente en la disposición angular del ligando CTZ alrededor del enlace Re-N.

Tabla 7. Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del metal en el polimorfo triclinico del complejo [Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>).

Enlace	Longitud de enlace [Å]	Enlaces	Ángulo [°]
C(1)-Re	1,927(5)	C(2)-Re-C(3)	89,4(2)
C(2)-Re	1,904(5)	C(2)-Re-C(1)	88,6(2)
C(3)-Re	1,926(5)	C(3)-Re-C(1)	88,5(2)
N(1A)-Re	2,191(3)	C(2)-Re-N(2A)	98,9(2)
N(2A)-Re	2,170(3)	C(3)-Re-N(2A)	171,7(2)
N(2B)-Re	2,179(3)	C(1)-Re-N(2A)	92,7(2)
---	---	C(2)-Re-N(2B)	171,3(1)
---	---	C(3)-Re-N(2B)	96,3(2)
---	---	C(1)-Re-N(2B)	98,2(2)
---	---	N(2A)-Re-N(2B)	75,4(1)
---	---	C(2)-Re-N(1A)	90,7(2)
---	---	C(3)-Re-N(1A)	95,0(2)
---	---	C(1)-Re-N(1A)	176,4(2)
---	---	N(2A)-Re-N(1A)	83,9(1)
---	---	N(2B)-Re-N(1A)	82,3(1)

Tabla 8. Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] alrededor del metal en los dos conformeros del polimorfo monoclinico del complejo [Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>).

Conformero 1		Conformero 2	
C(11)-Re(1)	1,907(6)	C(21)-Re(2)	1,900(6)
C(12)-Re(1)	1,908(6)	C(22)-Re(2)	1,923(6)
C(13)-Re(1)	1,924(6)	C(23)-Re(2)	1,919(6)
N(11A)-Re(1)	2,183(4)	N(21A)-Re(2)	2,177(4)
N(12A)-Re(1)	2,175(4)	N(22A)-Re(2)	2,178(4)
N(12B)-Re(1)	2,177(4)	N(22B)-Re(2)	2,179(4)
C(11)-Re(1)-C(12)	86,6(2)	C(21)-Re(2)-C(22)	86,9(2)
C(11)-Re(1)-C(13)	89,4(2)	C(21)-Re(2)-C(23)	87,4(2)
C(12)-Re(1)-C(13)	87,1(2)	C(22)-Re(2)-C(23)	88,1(2)
C(11)-Re(1)-N(12A)	92,1(2)	C(21)-Re(2)-N(22A)	95,8(2)
C(12)-Re(1)-N(12A)	99,9(2)	C(22)-Re(2)-N(22A)	97,8(2)
C(13)-Re(1)-N(12A)	172,9(2)	C(23)-Re(2)-N(22A)	173,3(2)
C(11)-Re(1)-N(12B)	98,7(2)	C(21)-Re(2)-N(22B)	93,6(2)
C(12)-Re(1)-N(12B)	173,1(2)	C(22)-Re(2)-N(22B)	173,3(2)
C(13)-Re(1)-N(12B)	97,3(2)	C(23)-Re(2)-N(22B)	98,5(2)
N(12A)-Re(1)-N(12B)	75,6(2)	N(22A)-Re(2)-N(22B)	75,5(2)
C(11)-Re(1)-N(11A)	175,5(2)	C(21)-Re(2)-N(21A)	178,2(2)
C(12)-Re(1)-N(11A)	92,2(2)	C(22)-Re(2)-N(21A)	93,8(2)
C(13)-Re(1)-N(11A)	94,9(2)	C(23)-Re(2)-N(21A)	94,2(2)
N(12A)-Re(1)-N(11A)	83,8(2)	N(22A)-Re(2)-N(21A)	82,5(2)
N(12B)-Re(1)-N(11A)	82,2(2)	N(22B)-Re(2)-N(21A)	85,5(2)

### 3.3 Caracterización de los compuestos en solución

#### 3.3.1 Resonancia magnética nuclear

Se caracterizaron los complejos mediante resonancia magnética nuclear unidimensional ( $^1\text{H}$ ) y bidimensional (COSY, HSQC). Todos los ensayos se realizaron en DMSO- $d_6$ . En la Figura 15 se muestra la numeración utilizada para las asignaciones.

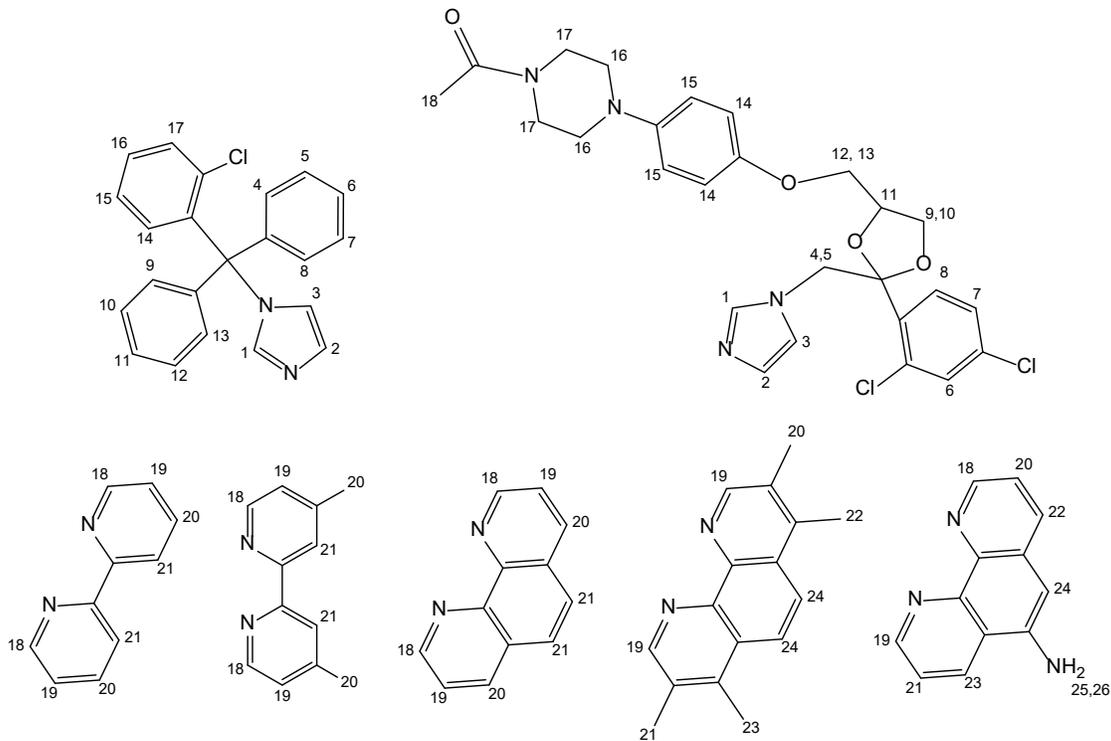
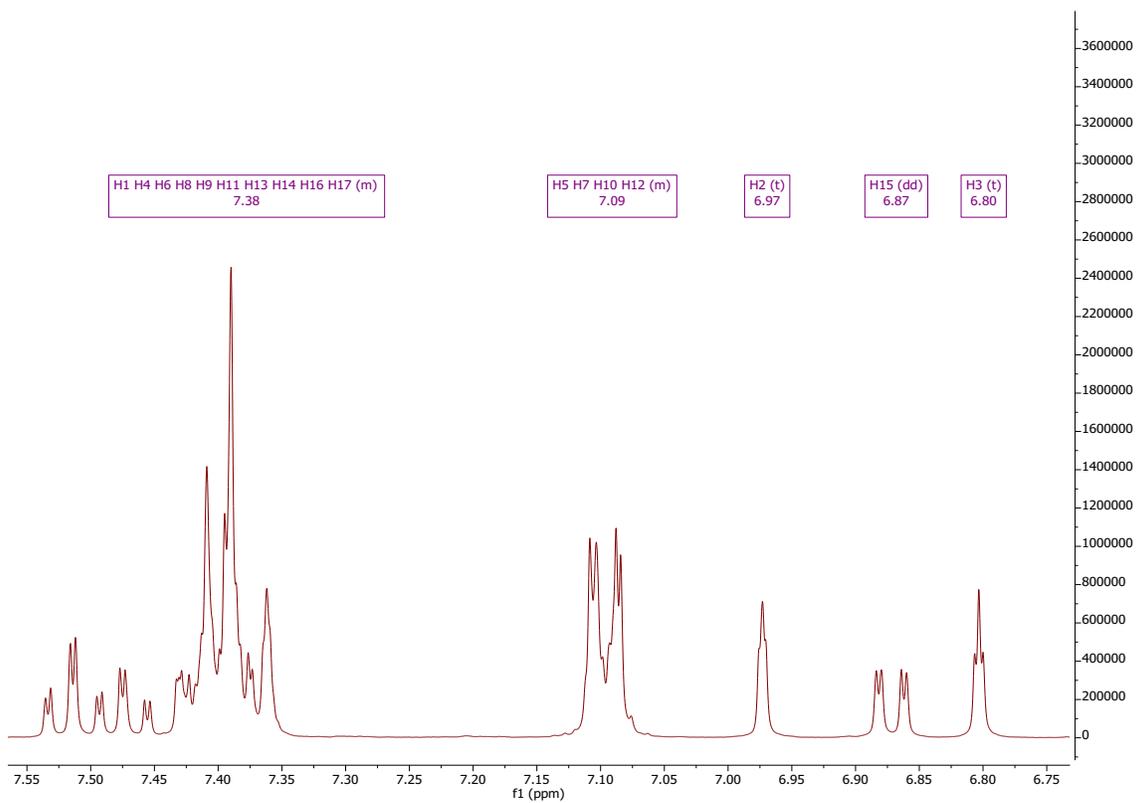
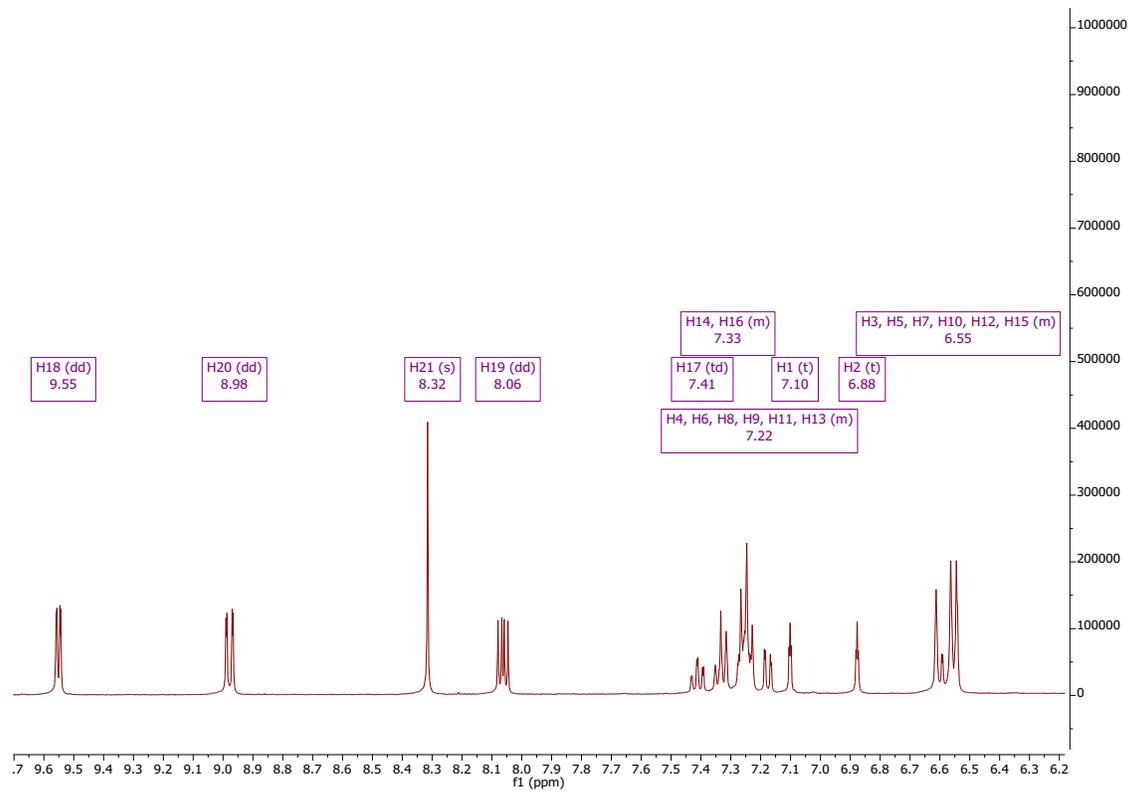
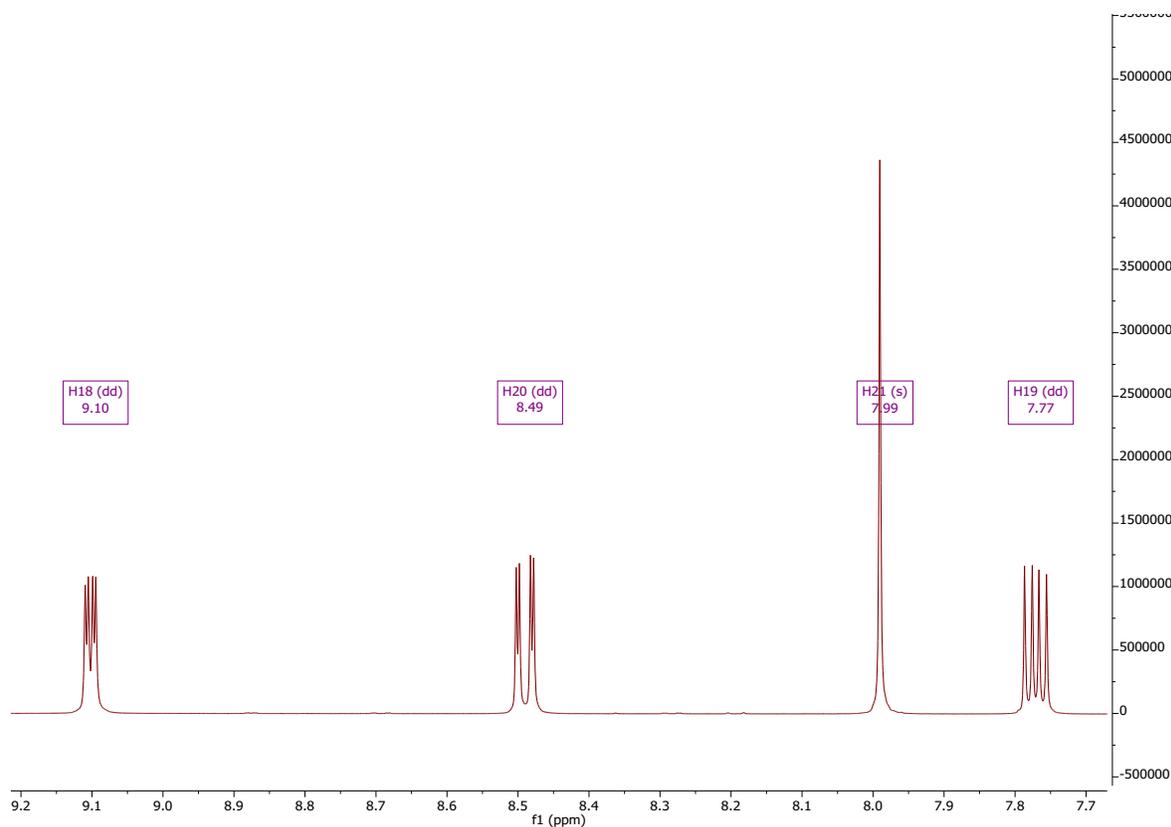


Figura 15. Numeración de los hidrógenos utilizada para los estudios mediante RMN.

Se realizaron espectros unidimensionales  $^1\text{H}$ -RMN tal como se muestra en el ejemplo de la Figura 16, tanto de los complejos sintetizados como de los ligandos NN y AZOL en su forma libre. La totalidad de los espectros se muestran en las Figuras A6 a A16 del Anexo. Las señales correspondientes al CTZ fueron de gran complejidad, tanto en su forma libre como en los complejos, debido al alto número de protones presentes en la molécula, presentando señales a desplazamientos esperados para los protones de anillos aromáticos, a excepción de los protones en el imidazol y en posición *orto* de los anillos aromáticos, donde el desplazamiento se apartó hacia ppm menores.





**Figura 16. Arriba: Espectro del complejo *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>). Centro: Espectro de CTZ. Abajo: Espectro de 1,10-fenantrolina.**

Los protones del imidazol presentaron un corrimiento de sus desplazamientos químicos hacia ppm menores al formarse los complejos, lo cual era de esperar, dado que son los protones más cercanos al nitrógeno que coordina de manera monodentada al centro metálico de Re(I). Este mismo comportamiento puede observarse en los estudios realizados sobre complejos de rutenio con CTZ reportados por Rodríguez-Arce *et al.* [10], así como en los estudios realizados por Sánchez-Delgado *et al.* [11]. Los protones en posición *orto* de los anillos aromáticos sufren un apartamiento notorio en cada uno de los complejos con respecto a su desplazamiento químico para el ligando CTZ libre.

Las señales de los protones restantes se afectan siempre hacia ppm menores, pero en una magnitud mucho menor respecto a los casos señalados anteriormente.

En el caso de los derivados de NN, se asignaron 4 señales para bipy, tmp, dmb y phen, mientras que para aminophen se asignaron 8 señales. Para los complejos con tmp, dmb y

KTZ, se observaron señales alrededor de 2,5 – 3,0 ppm correspondientes a los sustituyentes metilo, como era de esperarse.

Por su parte, las señales de los NN sufrieron desplazamientos hacia ppm mayores en todos los casos (desplazamiento hacia campo bajo). Asimismo, se verificó que no había presencia de ligando libre al no observarse en el espectro señales sin desplazamiento. Todas las señales correspondientes a los ligandos se presentaron en sus respectivos complejos manteniendo inalterada su multiplicidad, siendo posible confirmar su identidad.

A continuación, se resumen los resultados de  $^1\text{H}$ -RMN obtenidos para cada complejo sintetizado:

- **[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(CTZ)(phen)](PF<sub>6</sub>):**  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  9.55 (dd,  $J = 5.1, 1.4$  Hz, 2H, H<sub>18</sub>), 8.98 (dd,  $J = 8.3, 1.4$  Hz, 2H, H<sub>20</sub>), 8.32 (s, 2H, H<sub>21</sub>), 8.06 (dd,  $J = 8.3, 5.1$  Hz, 2H, H<sub>19</sub>), 7.41 (td,  $J = 7.7, 1.6$  Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.37 – 7.30 (m, 2H, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>), 7.29 – 7.16 (m, 6H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>13</sub>), 7.10 (m, 1H, H<sub>1</sub>), 6.88 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 6.57 – 6.53 (m, 6H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>15</sub>).
- **[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(CTZ)(aminophen)](PF<sub>6</sub>):**  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  9.48 (dd,  $J = 5.1, 1.2$  Hz, 1H, H<sub>18</sub>), 9.10 (dd,  $J = 8.6, 1.3$  Hz, 1H, H<sub>19</sub>), 9.02 (dd,  $J = 5.0, 1.2$  Hz, 1H, H<sub>22</sub>), 8.48 (dd,  $J = 8.5, 1.2$  Hz, 1H, H<sub>23</sub>), 8.00 (dd,  $J = 8.5, 5.1$  Hz, 1H, H<sub>20</sub>), 7.73 (dd,  $J = 8.4, 5.0$  Hz, 2H, H<sub>21</sub>), 7.43 (td,  $J = 7.7, 1.6$  Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.37 – 7.21 (m, 9H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>24</sub>), 7.10 (t,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 7.00 (m, 2H, H<sub>25</sub>, H<sub>26</sub>), 6.89 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 6.60 – 6.54 (m, 5H, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>15</sub>), 6.47 (m, 1H, H<sub>3</sub>).
- **[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(CTZ)(bipy)](PF<sub>6</sub>):**  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  9.13 (dd,  $J = 5.5, 1.4$  Hz, 2H, H<sub>18</sub>), 8.69 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H<sub>21</sub>), 8.34 (td,  $J = 7.9, 1.5$  Hz, 2H, H<sub>20</sub>), 7.78 – 7.69 (m, 2H, H<sub>19</sub>), 7.47 (td,  $J = 7.7, 1.6$  Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.40 – 7.32 (m, 8H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>), 7.06 (m, 1H, H<sub>1</sub>), 7.01 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 6.83 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 6.76 – 6.71 (m, 5H, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>15</sub>).
- **[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(CTZ)(dmb)](PF<sub>6</sub>):**  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8.93 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H, H<sub>18</sub>), 8.55 (d,  $J = 1.8$  Hz, 2H, H<sub>21</sub>), 7.58-7.53 (m, 2H, H<sub>19</sub>), 7.48 (td,  $J = 7.6, 1.6$  Hz, 1H, H<sub>17</sub>),

7.42 – 7.31 (m, 8H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>), 7.09 (m, 1H, H<sub>1</sub>), 7.02 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 6.80 – 6.69 (m, 6H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>15</sub>), 2.53 (s, 6H, H<sub>20</sub>).

- **[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(CTZ)(tmp)](PF<sub>6</sub>):** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.28 (s, 2H, H<sub>19</sub>), 8.39 (s, 2H, H<sub>24</sub>), 7.43 (td, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, H<sub>17</sub>), 7.31 – 6.19 (m, 8H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>), 7.10 (m, 1H, H<sub>1</sub>), 6.90 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 6.75 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 6.66 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H<sub>15</sub>), 6.60 – 6.55 (m, 4H, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>12</sub>), 2.82 (s, 6H, H<sub>22</sub>, H<sub>23</sub>), 2.55 (s, 6H, H<sub>20</sub>, H<sub>21</sub>).
- **[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(KTZ)(tmp)](PF<sub>6</sub>):** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.40 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H, H<sub>19</sub>), 8.38 (m, 2H, H<sub>15</sub>), 7.79 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.55 (m, 1H, H<sub>1</sub>), 7.23 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H<sub>14</sub>), 6.85 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 6.63 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 6.61 (m, 2H, H<sub>24</sub>), 4.33 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>), 4.08 (m, 1H, H<sub>11</sub>), 3.58 (m, 5H, H<sub>13</sub>, H<sub>16</sub>), 3.23 (m, 2H, H<sub>9</sub>, H<sub>12</sub>), 3.02 (dt, *J* = 2.5, 5.2 Hz, 4H, H<sub>17</sub>), 2.87 (dd, *J* = 8.3, 5.8 Hz, 1H, H<sub>10</sub>), 2.82 (s, 3H, H<sub>22</sub>), 2.74 (s, 3H, H<sub>23</sub>), 2.65 (s, 3H, H<sub>20</sub>), 2.63 (s, 3H, H<sub>21</sub>), 2.05 (s, 3H, H<sub>18</sub>).

### 3.3.2 Determinación de renio total mediante espectrometría de emisión atómica

Con el fin de realizar la determinación del contenido de renio en los compuestos sintetizados, y de esta forma contar con una herramienta importante para la caracterización de éstos que permitiera confirmar su naturaleza y su grado de pureza, se optimizó y validó un método analítico utilizando la técnica de emisión atómica MP-AES. Cabe destacar que esta técnica fue reportada como una herramienta para realizar determinaciones elementales de renio, por primera vez en este trabajo de tesis, poniendo de manifiesto la novedad del trabajo creativo.

En general, las técnicas de determinación basadas en espectrometría de absorción y emisión atómica son ampliamente utilizadas para el análisis cuantitativo de metales. Estas se basan en detectar la energía absorbida o emitida por los átomos, previamente aislados tras un proceso de atomización, al ser irradiados por energía. La energía tanto absorbida como emitida, dependiendo de la técnica, es característica para cada ion metálico presente en una determinada muestra.

Tradicionalmente, para la determinación de renio se han utilizado métodos espectrofotométricos, electroquímicos, de fluorescencia de Rayos X, entre otros. Sin

embargo, estos métodos suelen presentar problemas de falta de sensibilidad, mala reproducibilidad de los resultados, y fuertes interferencias de elementos tales como plata, tungsteno, molibdeno, platino, cobre o hierro [12].

Actualmente, las técnicas más utilizadas para la determinación de renio son la espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Pero a cambio de su gran poder, tienen como desventaja un alto costo operativo. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, es que se decidió buscar una herramienta alternativa, lo cual condujo a la optimización y validación de un nuevo método bioanalítico basado en la técnica MP-AES, disponible en el laboratorio de Química Analítica de Facultad de Química, UdelaR. Los elementos inorgánicos a nivel de trazas pueden ser determinados en diversas matrices mediante varios métodos, que consisten generalmente en una digestión asistida por microondas utilizando ácidos minerales y la posterior determinación mediante alguna técnica de espectrometría atómica. Es importante destacar que una tendencia en Química Analítica es evitar tratamientos drásticos y buscar procedimientos de extracción eficientes que utilicen condiciones suaves, de acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde [13]. En el caso del renio, se puede determinar por absorción atómica de llama (FAAS) utilizando una llama de óxido nitroso-acetileno con una concentración característica de alrededor de  $14 \text{ mg L}^{-1}$  a una longitud de onda de  $346,0 \text{ nm}$ . Sin embargo, debido a su alto punto de fusión de  $3186 \text{ }^\circ\text{C}$  y a su alto punto de ebullición de  $5900 \text{ }^\circ\text{C}$ , es prácticamente imposible su determinación mediante espectrometría de absorción atómica electrotérmica (ETAAS), ya que no se puede alcanzar una presión de vapor adecuada a las temperaturas predominantes [14]. En este contexto, se debe destacar el actual resurgimiento con varias mejoras de la técnica MP-AES, la cual puede considerarse como una estrategia para la determinación de elementos altamente refractarios como el renio. Esta técnica emplea el concepto de "funcionamiento con aire", trabajando con un plasma de nitrógeno que opera a alrededor de  $5000 \text{ K}$ , lo que resulta en un ahorro de costos y en la eliminación de cilindros de gases caros e inflamables del laboratorio [15-16]. Esta alta temperatura del plasma proporciona una tolerancia de matriz de muestra más alta, límites de detección más bajos

y un rango de concentración de trabajo ampliado, si se compara con la técnica FAAS. Sin embargo, no es la primera opción para la determinación de elementos a nivel de trazas, ya que los límites de detección no son tan bajos como los que se logran con otras técnicas como ET-AAS o ICP-MS [17-19]. Sin embargo, se demostró en el marco de este trabajo por primera vez, que la técnica MP-AES puede utilizarse como una herramienta para realizar análisis elemental de renio. Asimismo, también se discutió y se comparó un intento de realizar la determinación de renio por ET-AAS de acuerdo con la única publicación encontrada en la literatura científica [20].

### **3.3.2.1 Validación del método analítico mediante MP-AES**

El método analítico para la determinación de renio mediante MP-AES fue validado siguiendo las recomendaciones de la guía Eurachem [21]. Se realizó la validación utilizando calibración directa. Para la construcción de la curva de calibración se utilizaron cinco niveles de concentración. La linealidad se verificó en un rango adecuado para esta aplicación hasta 2,0 mg L<sup>-1</sup>, utilizando la prueba de bondad de ajuste [22]. Para todas las funciones de calibración, el valor del coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) fue superior a 0,999. La curva de calibración resultante fue: Intensidad = (8672,3 ± 104,0)\*Concentración (mg L<sup>-1</sup>) + (101,9 ± 1,5). Para la evaluación de la veracidad, se realizó una prueba *t* de Student para comparar el valor obtenido con el valor certificado de concentración de renio del SRM. El valor *t* experimental se encontró por debajo del *t* (0,05; 5) = 2,57, lo cual indicó que a un nivel de confianza del 95 %, la concentración obtenida no difería significativamente del valor certificado [22]. La recuperación promedio fue de 98 %. La precisión fue estimada como repetibilidad y expresada como desviación estándar relativa porcentual (% RSD) para el análisis del SRM (n = 6). Esta fue menor al 5 %, la cual se consideró adecuada para esta aplicación, considerando que las determinaciones analíticas se realizaron a niveles de trazas. Los resultados de veracidad y precisión confirmaron entonces la exactitud de los resultados obtenidos [21]. De manera de estimar los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), se utilizaron los criterios establecidos por la guía Eurachem, a saber, 3s y 10s, siendo “s” la desviación estándar del blanco [21]. Los límites resultaron ser adecuados para el objetivo

de este trabajo, estando el LOQ al menos cinco veces por debajo del menor valor obtenido en las muestras, suficiente para poder cuantificar renio con un nivel de confianza adecuado. Cabe señalar que este LOQ obtenido por MP-AES es ligeramente inferior al reportado por Koide *et al.* [20] utilizando ET-AAS. En suma, este método puede ser considerado como una alternativa confiable para realizar tanto estudios de tipo elemental como estudios metalómicos de renio. Además, la técnica MP-AES presenta varias ventajas sobre otras técnicas de espectrometría atómica ampliamente utilizadas, como se mencionó anteriormente.

A pesar de contar con la posibilidad de utilizar la técnica MP-AES, se realizaron también intentos de optimización para la determinación de renio mediante ET-AAS. La optimización de las temperaturas de pirólisis y atomización fue realizada de forma exhaustiva, realizando las correspondientes curvas de pirólisis de 1000 a 3000 °C a intervalos de 200 °C. Una vez que se encontraron los rangos de temperatura óptimos, el ajuste fino se realizó utilizando intervalos de 50 °C, obteniendo el programa de calentamiento presentado a continuación en la Tabla 9.

**Tabla 9. Programa de temperatura para la determinación de renio por ET-AAS.**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Rampa de temperatura (°C s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Time de espera (s)</b>	<b>Flujo de argón (L min<sup>-1</sup>)</b>
Secado	100	10	40	0,2
Pirólisis	1500	150	20	0,2
Atomización	2800	0	3	-
Limpieza	2850	0	3	0,2

De acuerdo con lo informado por Koide *et al.* [20], se observaron picos extremadamente anchos y una sensibilidad altamente dependiente de la temperatura de atomización. Se verificó que a temperaturas por debajo de 2800 °C no se producía una atomización completa de la muestra. Además, para evitar el efecto memoria, fueron necesarios varios ciclos de calentamiento a 2850 °C para obtener lecturas de línea de base, lo cual era muy desfavorable para la vida útil de los tubos de grafito, que son suministros de laboratorio de considerable costo. Todos estos inconvenientes, llevaron a una baja precisión del método, que resultó ser del 25 % expresado en RSD %. Bajo estas condiciones, se obtuvo un LOD

instrumental de 0,027 mg L<sup>-1</sup> empleando el criterio 3s recomendado por la guía Eurachem. Este valor estuvo de acuerdo con el reportado por Koide *et al.* [20] de 0,020 mg L<sup>-1</sup>. Todas las desventajas presentadas durante la determinación del renio mediante ET-AAS impulsaron el desarrollo y validación del método MP-AES.

Las cifras de mérito obtenidas luego de la validación del método para la determinación de renio mediante MP-AES se resumen a continuación en la Tabla 10:

**Tabla 10. Principales cifras analíticas de mérito obtenidas tras la validación de renio por MP-AES.**

Elemento	LOD (mg L <sup>-1</sup> ) (3s; n = 10)	LOQ (mg L <sup>-1</sup> ) (10s; n = 10)	Linealidad (mg L <sup>-1</sup> )	Precisión (%RSD; n = 6)*	Precisión (RSD %; n = 6)*
Re	0,005	0,015	0,015–2,0	4,5	98,0

\* SRM: NIST 1643e.

El procedimiento de preparación de muestras para los compuestos de renio haciendo uso de HNO<sub>3</sub> diluido y radiación de microondas fue muy eficiente, con la ventaja de que permitió reducir el uso de residuos peligrosos y los costos. La solución obtenida luego de la digestión asistida por microondas fue límpida y no se requirió ningún otro procedimiento extra, a excepción de la dilución con agua ultrapura previo análisis instrumental mediante MP-AES.

Los resultados del análisis elemental de renio concordaron con la fórmula propuesta para los cinco nuevos complejos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(NN)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y el complejo *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(NN)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) tal como se muestra en la Tabla 11, encontrándose los porcentajes de recuperación entre el valor experimental y el teórico en el rango 97–101 %.

**Tabla 11. Análisis elemental de renio total mediante MP-AES.**

Compuesto	Re teórico (%)	Re experimental (%)	Recuperación (%)
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	19,8	19,5	99
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	19,5	19,0	97
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	19,7	19,3	98
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	20,3	20,5	101
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	18,7	18,3	98
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(KTZ)](PF <sub>6</sub> )	10,5	10,4	99

Estos resultados además de contribuir con la validación general del método desarrollado demostraron una buena selectividad hacia el renio en muestras reales, siendo

complementarios a los análisis elementales realizados. A la luz de los resultados de este trabajo, se logró la obtención de información extra para la caracterización por medio de un método innovador, ya que no existían reportes previos de esta técnica aplicada a métodos bioanalíticos para la determinación de contenido de este metal, demostrando por primera vez que la técnica MP-AES se puede utilizar como herramienta para realizar ensayos de análisis elemental de renio.

### **3.4 Estudios de lipofilia**

La lipofilia es una propiedad importante de las moléculas en relación con su actividad biológica, y determina el comportamiento de un potencial fármaco en un medio biológico dado. Su aplicación se ha demostrado en relación con la capacidad de potenciales fármacos de atravesar la barrera hematoencefálica y con la absorción intestinal [23]. Resulta determinante para su capacidad de atravesar membranas biológicas en general [24-25]. Por lo tanto, la lipofilia es de gran importancia desde el punto de vista farmacocinético, en especial influyendo en la absorción, distribución, excreción y toxicidad de potenciales fármacos [26-27].

Todo esto genera que sea una propiedad fisicoquímica importante a la hora de diseñar nuevos fármacos. Por este motivo, es de vital importancia realizar estudios para determinar si existe una correlación entre la lipofilia de un cierto compuesto y su actividad biológica. Inicialmente se realizaron ensayos de lipofilia mediante TLC, los resultados no fueron concluyentes y el método presentaba poca capacidad para diferenciar la magnitud de la lipofilia entre los compuestos ensayados, es decir, que la resolución no era la adecuada. Como alternativa se diseñó un método para la determinación mediante HPLC-DAD y se realizaron paralelamente ensayos para determinar la lipofilia mediante el coeficiente de reparto octanol – buffer PBS.

En este sentido, la cromatografía líquida de alta performance en modo fase reversa (RP-HPLC) ha sido utilizada como una herramienta para la determinación de la lipofilia de diversos compuestos durante mucho tiempo, ya que la mayoría de las fuerzas hidrófobas dominan el proceso de retención [23]. En particular, es de gran utilidad para el estudio de sistemas complejos, en los cuales la separación de los compuestos en estudio se hace difícil

por los métodos de cromatografía en capa fina o en *batch*. Por lo tanto, en el marco de este trabajo de tesis se probaron distintas condiciones cromatográficas, con el fin de separar los cinco compuestos de interés en una única corrida isocrática.

### 3.4.1 Resultados de los estudios de lipofilia mediante TLC

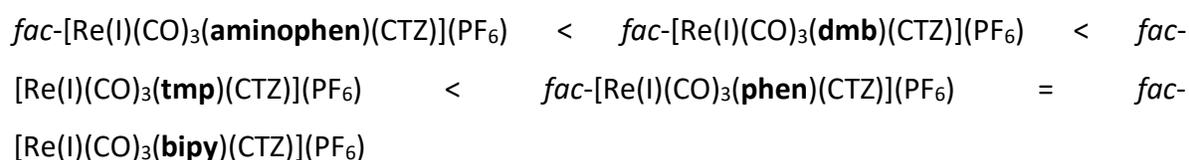
Se realizó el ensayo de lipofilia por duplicado, en dos corridas (corrida 1 y corrida 2) y se promediaron los  $R_F$  para luego calcular el  $R_M$  correspondiente. Los resultados se pueden observar en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de ensayo de lipofilia mediante TLC.

Compuesto	$R_F$ (corrida 1)	$R_F$ (corrida 2)	$R_F$ promedio	$R_M$
CTZ (clotrimazol)	0,79	0,85	0,82	-0,66
bipy (2,2'-bipiridina)	0,79	0,82	0,81	-0,62
dmb (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)	0,78	0,77	0,78	-0,54
phen (1,10-fenantrolina)	0,69	0,72	0,71	-0,38
aminophen (5-amino-1,10-fenantrolina)	0,59	0,65	0,62	-0,21
tmp (3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)	0,52	0,53	0,53	-0,04
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	0,24	0,25	0,25	0,49
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	0,22	0,23	0,23	0,54
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	0,21	0,23	0,22	0,55
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	0,18	0,21	0,20	0,62
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	0,19	0,20	0,20	0,62

En general la lipofilia de todos los compuestos finales se encuentra dentro del mismo orden de magnitud, y se diferencia claramente de los ligandos libres, los cuales presentan un comportamiento de menor lipofilia (valor de  $R_M$  inferior).

El orden de lipofilia de los complejos finales, ordenados según lipofilia creciente, fue:



Sin embargo, la separación de las manchas correspondientes a los complejos, es decir la diferencia de  $R_F$ , fue muy pequeña, ya que éstas se presentaban muy difusas. A pesar de varios intentos por encontrar una fase móvil adecuada, no fue posible desarrollar un sistema mediante TLC con una fase que permitiera una separación óptima. Por este motivo, los resultados no fueron considerados concluyentes y se prosiguió con la realización de los ensayos de lipofilia mediante HPLC-DAD y reparto en octanol – buffer PBS.

### 3.4.2 Resultados de los estudios de lipofilia mediante HPLC

Una vez optimizadas las condiciones cromatográficas, se obtuvo el cromatograma que se observa en la Figura 17, siendo los tiempos de retención de los complejos: 14,82 min para *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), 18,09 min para *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(dmb)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), 18,92 min para *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(bipy)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), 25,41 min para *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), 29,28 min para *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y 34,69 min para *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>), respectivamente. El tiempo muerto fue de 3,48 min, de acuerdo con la elución de amarillo tartrazina.

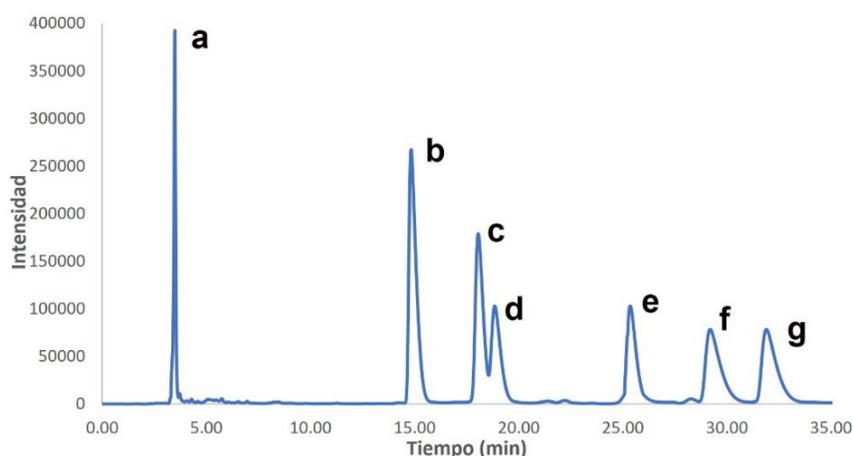


Figura 17. Cromatograma obtenido a partir de la mezcla de los seis complejos y amarillo tartrazina. a) amarillo tartrazina, b) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), c) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(dmb)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), d) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(bipy)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), (e) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), f) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), g) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>).

A partir de los parámetros cromatográficos  $t_0$  y  $t_R$ , se pudo calcular el parámetro  $R_F$  de acuerdo con lo reportado por Bate-Smith & Westall [28], siendo  $t_c$  el tiempo total de la corrida de 35 min. Asimismo, se calcularon los parámetros  $R_M$  para cada uno de los compuestos. Las ecuaciones se describen a continuación:

$$R_F = \frac{t_R - t_0}{t_c} \quad R_M = \log_{10}\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$$

Debido a que los valores de  $R_M$  varían directamente con el coeficiente de partición y también, en muchos casos, cambian en incrementos iguales con cada adición sucesiva de un grupo sustituyente particular, son más útiles que los correspondientes valores de  $R_F$ . Una propiedad particularmente útil del parámetro  $R_M$ , respecto al parámetro  $R_F$ , es que el primero es una función simple de la temperatura y de los volúmenes relativos de las fases del disolvente [28]. Además, con esta estrategia se pueden comparar varias series de posibles agentes quimioterapéuticos en un mismo sistema cromatográfico. Un mayor valor de  $R_M$  está asociado con un mayor grado de sustitución polar, esto puede significar que el cambio en el potencial químico causado por un grupo sustituyente es menor cuanto mayor es la sustitución polar ya existente en la molécula. Por otro lado, se obtiene un valor de  $R_M$  negativo cuando el término  $[(1/R_F) - 1]$  es menor a 1, lo cual se logra cuando se observa un  $R_F$  lo suficientemente alto para el compuesto analizado, lo que se asocia con un mayor grado de sustitución no polar y por lo tanto una mayor lipofilia [28].

Los valores de  $R_F$  y  $R_M$  obtenidos para este experimento se detallan en la Tabla 13.

**Tabla 13. Datos cromatográficos y parámetros  $R_F$  y  $R_M$  para cada compuesto.**

Compuesto	$t_R$ (min)	$R_F$	$R_M$
amarillo tartrazina	3,48	$R_F$	$R_M$
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	14,82	0,32	0,32
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	18,09	0,42	0,14
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	18,92	0,44	0,10
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	25,41	0,63	-0,22
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	29,28	0,73	-0,45
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(KTZ)](PF <sub>6</sub> )	32,09	0,82	-0,65

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que el orden de lipofilia creciente de los compuestos fue el siguiente: *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**phen**)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) < *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**dmb**)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) < *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**bipy**)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) < *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**aminophen**)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) < *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**tmp**)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) < *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**tmp**)(KTZ)](PF<sub>6</sub>).

### 3.4.3 Resultados de los estudios de lipofilia por coeficiente de reparto octanol – PBS

Luego de aplicar el clásico método en *batch* de coeficiente de reparto octanol – buffer PBS, se arribó a resultados similares a los obtenidos anteriormente por el método cromatográfico. Tal como se puede observar en la Tabla 14, la lipofilia del compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) no pudo determinarse por este método ya que se descomponía durante el ensayo.

Tabla 14. Coeficientes de distribución de los complejos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(NN)(azol)](PF<sub>6</sub>) en octanol – buffer PBS

Compuesto	LogP
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	2.85
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	3.18
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	4.00
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	ND*
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	4.26
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(KTZ)](PF <sub>6</sub> )	6.69

\*ND = No Detectado

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que la lipofilia de los compuestos, presentada en orden creciente, es la siguiente: *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**phen**)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) < *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**dmb**)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) < *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**bipy**)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) < *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**aminophen**)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) < *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**tmp**)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) < *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(**tmp**)(KTZ)](PF<sub>6</sub>).

Estos resultados fueron concordantes con los hallados por la técnica HPLC-DAD, donde se pudo observar la misma tendencia. Al contrastar estos resultados con los resultados de los ensayos biológicos que se presentan más adelante en la Sección 3.6 para los compuestos con CTZ, se pudo constatar que el compuesto que presentaba mayor lipofilia coincide con el compuesto claramente más activo contra *T. cruzi*. De igual forma el compuesto que presenta menor lipofilia coincide con el compuesto menos activo contra *T. cruzi*. Sin embargo, la relación lipofilia/actividad no se cumple de manera estricta para los demás compuestos, que muestran una actividad similar.

### 3.5 Estabilidad en solución

La estabilidad de los potenciales fármacos organometálicos es un parámetro crucial en el marco de la Química Medicinal. La estabilidad muestra la capacidad de un potencial fármaco de conservar sus propiedades físicas, químicas, microbiológicas y biológicas dentro de límites especificados, en un medio dado.

A raíz de esto, cada vez es más común la realización de ensayos para determinar la estabilidad de los compuestos desarrollados en Química Medicinal en distintos medios como ser buffers, disolventes, plasma humano, entre otros. Estudiar la estabilidad confiere información importante que puede incidir en la viabilidad de un compuesto como potencial fármaco. Por ejemplo, una rápida degradación del compuesto en plasma humano significaría una gran desventaja para la mayoría de los fármacos, al administrarse en el torrente sanguíneo [29].

La estabilidad química depende de las propiedades fisicoquímicas inherentes al analito, éstas pueden derivar en la oxidación, hidrólisis o isomerización del compuesto a lo largo del tiempo. Además, la pérdida de analito en la solución puede ocurrir debido a la agregación, la precipitación o la unión no covalente a los componentes de la matriz o a las superficies de recipientes de vidrio o plástico, reduciendo así la cantidad de analito en la muestra. Aunque estos procesos pueden ocurrir tanto en ambientes biológicos como no biológicos, la presencia de proteínas y lípidos en muestras biológicas proporciona oportunidades adicionales para la unión no covalente, el secuestro o la precipitación que no están presentes en ambientes no biológicos [30].

En el marco de este trabajo, la estabilidad de los complejos sintetizados fue estudiada en DMSO, DMSO: medio símil biológico (50:50), DMSO: medio BHI (50:50) y DMSO: suero fetal bovino (50:50) en el laboratorio del Área Química Analítica de Facultad de Química, UdelaR. Complementariamente, como parte de una pasantía incluida en el Plan de Actividades de esta tesis, se realizaron ensayos de estabilidad en plasma humano en el laboratorio del Grupo Gasser, Chimie ParisTech, PSL University, Paris, Francia.

### 3.5.1 Resultados de los estudios de estabilidad

En todos los ensayos de estabilidad se obtuvieron los cromatogramas a tiempo inicial ( $t=0$ ) y luego se compararon con los respectivos cromatogramas a tiempo final ( $t = 1$  día o  $t = 5$  días, dependiendo del medio), de forma de evaluar la estabilidad del área del pico cromatográfico, la forma del pico y la aparición de nuevos picos. Asimismo, se comparó contra los cromatogramas de los precursores y los ligandos libres, inyectados en forma independiente, para contrastar los tiempos de retención.

A continuación, se muestran los principales resultados obtenidos en cada uno de los medios ensayados y una discusión global.

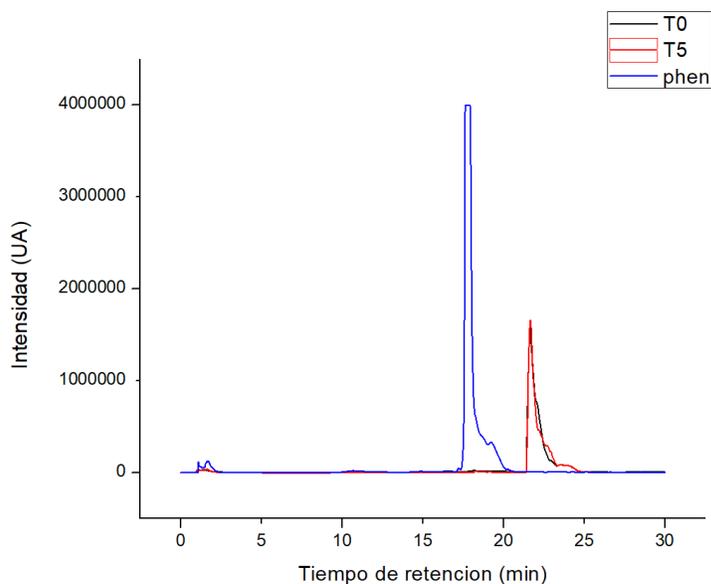
#### Ensayos de estabilidad en DMSO 100 %

En la Tabla 15 se pueden observar los resultados de estabilidad en DMSO puro. Allí se aprecian los tiempos de retención de cada compuesto y cada ligando libre, así como las áreas de los picos cromatográficos correspondientes en el período de incubación de los compuestos entre  $t=0$  y  $t=5$  días. Se incluye el porcentaje de recuperación de las áreas respecto a las áreas obtenidas a  $t=0$ .

Tabla 15. Estabilidad en DMSO 100%.

Estabilidad en DMSO	$t_R$ (t=0)	Área (t=0)	$t_R$ (t=5)	Área (t=5)	%
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	21,644	56941837	21,676	56408490	99,0
1,10-fenantrolina	17,643				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	22,298	51654723	22,228	50807473	98,4
5-amino-1,10-fenantrolina	14,421				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	22,155	70160999	22,213	67123811	95,7
2,2'-bipiridina	16,939				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	22,476	13607242	22,460	13272008	97,5
4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina	19,303				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	23,178	18477193	23,167	17811213	96,4
3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina	21,723				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(KTZ)](PF <sub>6</sub> )	23,131	13993726	23,085*	14709908	105,1

A modo de ejemplo se incluye en la Figura 18 los cromatogramas superpuestos para el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) a t=0 y t=5 días, así como el cromatograma del ligando phen libre. Se puede observar la completa superposición de los picos negro (t=0) y rojo (t=5), correspondientes al compuesto. El resto de los cromatogramas se encuentran en las Figuras A17 a A21 del Anexo.



**Figura 18. Cromatogramas de ensayo de estabilidad de [Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en DMSO 100 %, a modo de ejemplo.**

#### **Ensayos de estabilidad en DMSO: medio símil biológico (50:50)**

En la Tabla 16 se pueden observar los resultados de estabilidad en DMSO: medio símil biológico (50:50). Allí se aprecian los tiempos de retención de cada compuesto y cada ligando libre, así como las áreas de los picos cromatográficos correspondientes en el período de incubación entre t=0 y t=5 días. Se incluye el porcentaje de recuperación de las áreas respecto a las áreas obtenidas a t=0.

Tabla 16. Estabilidad DMSO: medio símil biológico (50:50)

Estabilidad DMSO : Símil biológico (50:50)	t <sub>R</sub> (t=0)	Área (t=0)	t <sub>R</sub> (t=5)	Área (t=5)	%
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	21,771	26216442	21,710	26133684	99,7
1,10-fenantrolina	17,643	120236712			
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	22,356	25759287	22,315	25343650	98,4
5-amino-1,10-fenantrolina	14,421				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	22,282	11652140	22,333	11296598	96,9
2,2'-bipiridina	16,939				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	22,525	5928152	22,548	5394618	91,0
4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina	19,303				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	23,198	10411161	23,260	9826168	94,4
3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina	21,723				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(KTZ)](PF <sub>6</sub> )	23,072	5086729	23,066*	5159129	101,4

A modo de ejemplo se incluye en la Figura 19 los cromatogramas para el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) a t=0 y t=5, así como el cromatograma del ligando phen libre. Se puede observar la completa superposición de los picos negro (t=0) y rojo (t=5), correspondientes al compuesto. El resto de los cromatogramas se encuentran en las Figuras A22 a A26 del Anexo.

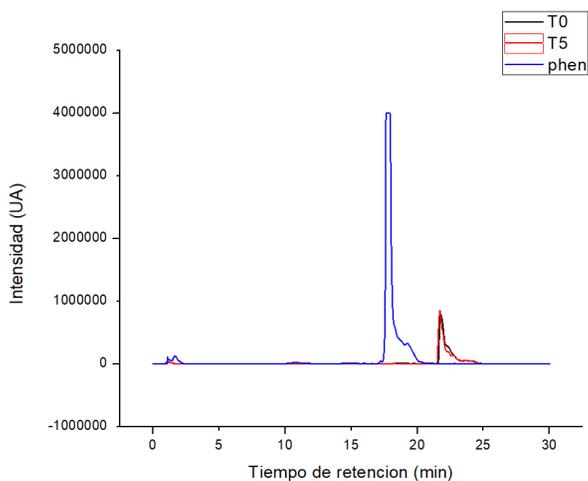


Figura 19. Cromatogramas de ensayo de estabilidad de [Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en DMSO: medio símil biológico (50:50), a modo de ejemplo.

### Ensayos de estabilidad en DMSO: medio BHI (50:50)

En la Tabla 17 se pueden observar los resultados de estabilidad en DMSO: medio BHI suplementado (50:50). Allí se aprecian los tiempos de retención de cada compuesto y cada ligando libre, así como las áreas de los picos cromatográficos correspondientes en el período de incubación entre t=0 y t=1 día. Se incluye el porcentaje de recuperación de las áreas respecto a las áreas obtenidas a t=0.

**Tabla 17. Estabilidad en DMSO: medio BHI complementado (50:50)**

Estabilidad en DMSO: medio BHI (50:50)	t <sub>R</sub> (t=0)	Área (t=0)	t <sub>R</sub> (t=1)	Área (t=1)	%
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	22,030	8971432	22,067	8114126	90,4
1,10-fenantrolina	17,056				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	22,324	7788841	22,399	3099343	39,8
5-amino-1,10-fenantrolina	14,197				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	21,983	14325860	22,167	15193610	106,0
2,2'-bipiridina	16,361				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	22,420	6698811	22,404	6785824	101,3
4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina	19,148				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	23,132	1797400	23,160	1675503	93,2
3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina	21,526				
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(KTZ)](PF <sub>6</sub> )	23,054	6706316	23,062	6458619	96,3

A modo de ejemplo se incluye en la Figura 20 los cromatogramas para el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) a t=0 y t=5, así como el cromatograma del ligando phen libre. Se puede observar la completa superposición de los picos negro (t=0) y rojo (t=5), correspondientes al compuesto. El resto de los cromatogramas se encuentran en las figuras A27-A31 del Anexo.

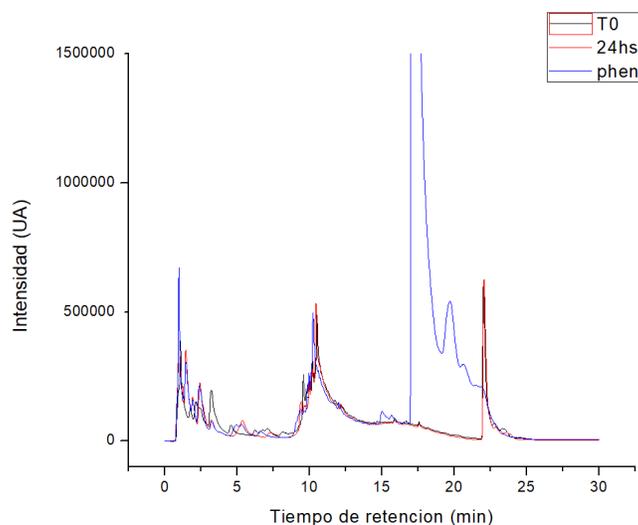


Figura 20. Cromatogramas de ensayo de estabilidad de *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en BHI 100 %, a modo de ejemplo.

### Ensayos de estabilidad en DMSO: suero fetal bovino (50:50)

En las Figuras 21 y 22 se muestran los cromatogramas para los ensayos en DMSO: suero fetal bovino (50:50) para todos los compuestos en estudio a t=0 y t=1 día de incubación.

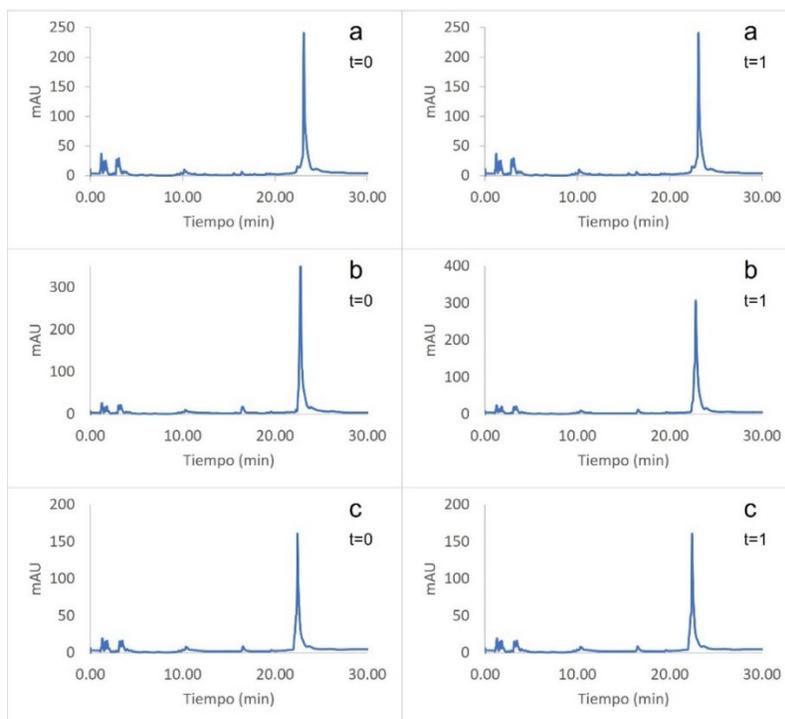


Figura 21. Cromatogramas obtenidos para a) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), b) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(dmb)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y c) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(bipy)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) a t=0 y t=1 día, respectivamente.

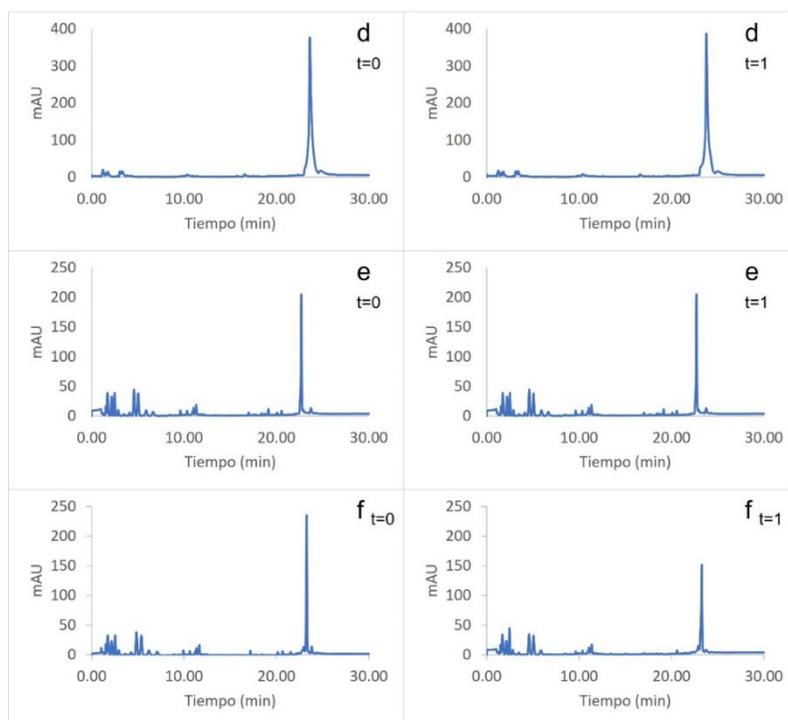


Figura 22. Cromatogramas obtenidos para d) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), e) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y f) *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) a t=0 y t=1 día, respectivamente.

### Ensayos de estabilidad en disolventes y medios biológicos: discusión global

En todos los medios ensayados se observó a t=0 un único pico principal, correspondiente al complejo en estudio. El área a t=0 se consideró como el 100 %.

En resumen, todos los cromatogramas evaluados mostraron una señal intensa correspondiente al complejo, a distinto tiempo de retención respecto a la de sus correspondientes ligandos libres. En algunos casos el pico del compuesto presentó un leve *tailing*, hecho que pudo atribuirse al pequeño tamaño de partícula del relleno de la columna cromatográfica.

Las áreas de los picos no presentaron una alteración sustancial en su valor durante el tiempo de incubación, excepto para el ensayo de estabilidad de los compuestos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en medio DMSO: BHI complementado (50:50) y *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) en DMSO: medio suero bovino fetal (50:50). Asimismo, la forma de los picos se vio inalterada con el correr del tiempo, para un mismo compuesto. Los porcentajes de recuperación de las áreas se encontraron en el rango 90,4 – 106,0 %. Esta

desviación en el entorno  $\pm 10\%$  puede atribuirse a la decomposición del compuesto, pero ésta es aceptable. Se pudo observar un leve aumento de las áreas a tiempo final en casos puntuales, lo cual puede atribuirse a pequeñas pérdidas de disolvente por evaporación durante el período de ensayo.

Como se comentaba antes, solamente se observó problemas de estabilidad para el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en medio DMSO: BHI complementado (50:50), donde se evidenció una disminución significativa a  $t = 1$  día de incubación, con una recuperación de 39,8 %. A raíz de esto, se verificó la estabilidad a  $t = 2$  días, no evidenciándose variaciones respecto a lo observado a  $t = 1$ . Asimismo, para el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) se observó una disminución significativa del 35 % en su área de pico en DMSO: medio suero bovino fetal (50:50) a  $t = 1$ , mostrando que este compuesto se descompone parcialmente en dicho medio de incubación en un período de 1 día.

En términos generales, la estabilidad de los compuestos, estimada como el porcentaje de recuperación del área de pico, en comparación con el área total a  $t=0$ , resultó mayor a 90 % en todos los medios ensayados, dentro de los tiempos de incubación evaluados, a excepción de los dos casos ya comentados. Esto se puede considerar como una estabilidad exitosa para los compuestos en estudio.

En resumen, la estabilidad química de los compuestos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(NN)(AZOL)](PF<sub>6</sub>) en los medios ensayados se confirmó durante un período de 5 días para DMSO y DMSO: medio biológico sintético (50:50) y durante un período de 1 día para DMSO: medio BHI suplementado (50:50) y DMSO: suero bovino fetal (50:50). Sin embargo, se observaron descomposiciones parciales para los compuestos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>), en algunos medios de incubación, como ya fue comentado.

### **Ensayos de estabilidad en plasma humano**

Como se muestra en la Tabla 18, los compuestos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(NN)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) fueron estables en plasma humano durante un período de 24 horas. Esto se pudo confirmar a partir de los valores prácticamente constantes de la relación Área de compuesto ( $A_{\text{Compuesto}}$ )/Área de cafeína ( $A_{\text{Cafeína}}$ ), y la no aparición de nuevos picos cromatográficos a lo largo del tiempo.

Esta relación se utilizó para el seguimiento de la estabilidad después de haber sido normalizada al 100 %. Esta estrategia de trabajo es de gran utilidad ya que presenta la ventaja de que la tasa de recuperación analítica del compuesto no afecta los resultados del experimento.

**Tabla 18. Resultados de estabilidad de los compuestos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(NN)(AZOL)](PF<sub>6</sub>) a diferentes tiempos de incubación en plasma humano, utilizando cafeína como patrón interno.**

Compuesto	A Compuesto	A Cafeína (t <sub>R</sub> = 3,159)	A Compuesto/A Cafeína
Blanco t = 0 h	-	460,37	-
Blanco t = 24 h	-	12,65	-
<b><i>fac</i>-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) (t<sub>R</sub> = 2,599)</b>			
t = 0 h	-	716,12	
t = 1 h	220,40	620,92	1,0
t = 3 h	583,81	525,19	1,1
t = 6 h	423,42	373,48	1,1
t = 24 h	344,10	382,26	0,9
<b><i>fac</i>-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(dmb)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) (t<sub>R</sub> = 1,838)</b>			
t = 0 h	374,67	426,74	0,9
t = 1 h	275,11	225,67	1,2
t = 3 h	288,95	258,31	1,1
t = 6 h	429,38	344,59	1,2
t = 24 h	292,39	263,15	1,1
<b><i>fac</i>-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(bipy)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) (t<sub>R</sub> = 1,778)</b>			
t = 0 h	431,89	400,43	1,1
t = 1 h	426,02	421,83	1,0
t = 3 h	456,18	480,07	1,0
t = 6 h	519,30	428,57	1,2
t = 24 h	420,12	381,68	1,1
<b><i>fac</i>-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) (t<sub>R</sub> = 1,774)</b>			
t = 0 h	393,10	394,55	1,0
t = 1 h	284,25	242,26	1,2
t = 3 h	754,83	554,74	1,4
t = 6 h	545,46	458,02	1,2
t = 24 h	314,31	292,41	1,1
<b><i>fac</i>-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) (t<sub>R</sub> = 1,745)</b>			
t = 0 h	354,63	406,65	0,9
t = 1 h	288,59	393,05	0,7
t = 3 h	121,97	174,36	0,7
t = 6 h	247,62	332,45	0,7
t = 24 h	377,81	477,84	0,8
<b><i>fac</i>-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) (t<sub>R</sub> = 1,791)</b>			
t = 0 h	811,75	299,05	3,0
t = 1 h	1059,71	321,89	3,3
t = 3 h	576,42 256,38 (pico 2)	367,31	1,6*

t = 6 h	536,04 256,71 (pico 2)	292,11	1,8*
t = 24 h	628,32 656,40 (pico 2)	462,74	1,4*
<b>CTZ (t<sub>R</sub> = 2,047)</b>			
t = 0 h	19,5	403,39	0,05
t = 1 h	21,2	468,87	0,05
t = 3 h	18,7	366,52	0,05
t = 6 h	15,3	276,71	0,06
t = 24 h	16,7	279,93	0,06

\*Descomposición parcial del compuesto, aparición de un segundo pico (pico 2).

A = área del pico cromatográfico.

Sin embargo, el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) fue estable en plasma humano solo durante un período de 1 h. Como se muestra en la Tabla 18, a partir de las 3 h de incubación la relación  $A_{\text{Compuesto}}/A_{\text{Cafeína}}$  para este compuesto disminuyó a la mitad de su valor inicial, mientras que apareció una segunda señal (pico 2, Tabla 18). La aparición de esta segunda señal se puede apreciar en el cromatograma de la Figura 23. Esta división del pico estaría asociada con la descomposición parcial del compuesto en estudio.

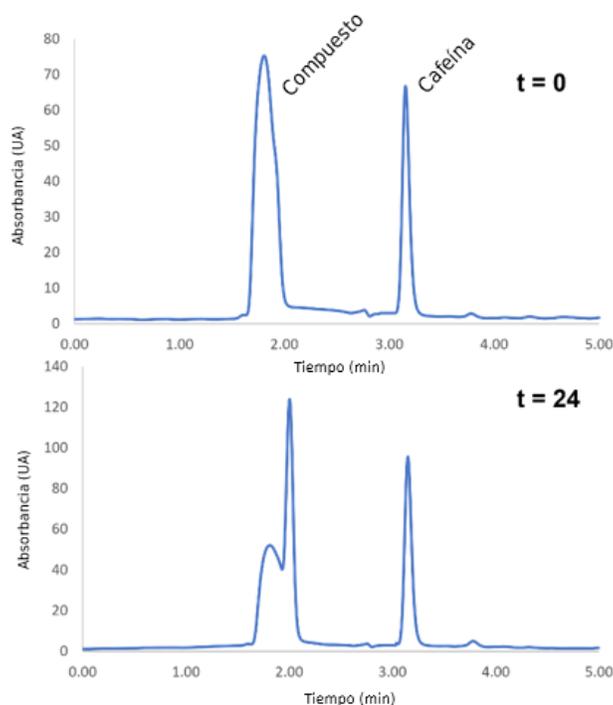


Figura 23. Cromatogramas obtenidos para el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) a t = 0 y t = 24 h.

### **3.6 Actividad biológica *in vitro* contra *T. cruzi***

Se realizaron ensayos de actividad biológica *in vitro* contra *T. cruzi*, para determinar las propiedades antiproliferativas de los compuestos sintetizados. Se determinaron los valores de IC<sub>50</sub> de cada uno de ellos y de los respectivos ligandos libres mediante ensayos de viabilidad luego de la incubación del parásito con diferentes concentraciones de compuesto. Estos ensayos fueron efectuados sobre parásitos en dos etapas diferentes de su ciclo vital, en algunos casos sobre la forma epimastigota (cepa Dm28c) y en otros sobre la forma infectiva tripomastigota (cepa CL Brener). A diferencia de la forma tripomastigota (forma infectiva del parásito), la forma epimastigota es una etapa del parásito que no se presenta en la persona infectada sino en el insecto vector [31]. De todas formas, es de utilidad para obtener información en ensayos biológicos, ya que provee información importante, pero con la ventaja de ser más segura y sencilla de trabajar (al no ser forma infectiva requiere de menos precauciones y protocolos de bioseguridad más simples). La actividad en *T. cruzi* fue expresada en valores de IC<sub>50</sub>. Se determinó la actividad del fármaco de referencia Nifurtimox con fines comparativos.

#### **3.6.1 Actividad *in vitro* en epimastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28c, citotoxicidad sobre células HeLa y selectividad hacia el parásito**

Se evaluó la actividad de los complejos *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(NN)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) y su toxicidad en células tipo HeLa como células mamíferas modelo (Tabla 19). Se incluyó el índice de selectividad (IS), que es un valor que representa la selectividad, el cual fue calculado como  $IS = IC_{50} \text{ HeLa} / IC_{50} \text{ } T. \text{ cruzi}$ .

Tabla 19. Resultados de IC<sub>50</sub> en *T. cruzi* (epimastigotas Dm28c) y células HeLa.

Compuesto	IC <sub>50</sub> HeLa ± DE (μM)	IC <sub>50</sub> <i>T. cruzi</i> ± DE (μM)	IS
CTZ	45,4 ± 4,7	22,23 ± 0,47	2,0
phen	157,0 ± 17,3	10,25 ± 0,26	15,3
aminophen	125,5 ± 7,8	9,37 ± 1,02	13,4
tmp	29,9 ± 2,3	3,43 ± 0,85	8,7
bipy	107,3 ± 12,0	12,52 ± 0,82	8,5
dmb	90,2 ± 15,8	10,60 ± 2,42	8,5
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	13,0 ± 3,9	9,42 ± 1,53	1,4
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	35,6 ± 1,4	8,43 ± 2,20	4,2
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	10,9 ± 1,6	3,48 ± 0,98	3,1
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	6,1 ± 1,1	7,53 ± 2,68	0,8
<i>fac</i> -[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	13,9 ± 6,4	8,48 ± 1,46	1,6
Nifurtimox	> 100	7,10 ± 2,20	> 14

Los complejos mostraron actividad en el rango micromolar y en casi todos los casos la actividad fue superior a la de sus respectivos ligandos bioactivos libres (a menor valor de IC<sub>50</sub> mayor actividad). Asimismo, los valores de IC<sub>50</sub> fueron del mismo orden del obtenido para el fármaco de referencia Nifurtimox, destacando que todos ellos presentan mayor actividad que dicho fármaco. No se obtuvieron resultados para el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) debido a que la solubilidad de este compuesto era extremadamente baja en los disolventes utilizados, impidiendo la realización del ensayo mediante este método.

### 3.6.2 Actividad *in vitro* en tripomastigotas de *T. cruzi* cepa CL Brener, citotoxicidad sobre células VERO y selectividad hacia el parásito

Se evaluó la actividad de los compuestos *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(NN)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) y el compuesto *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) en tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Brener) y su toxicidad en células mamíferas tipo VERO (ATCC CCL81). Los resultados se resumen en la Tabla 20. Se incluyó el valor de IS como medida de selectividad, el cual fue calculado como IS = IC<sub>50</sub> VERO / IC<sub>50</sub> *T. cruzi*.

**Tabla 20. Resultados de IC<sub>50</sub> en *T. cruzi* (tripomastigotas CL Brener) y células VERO.**

Compuesto	IC <sub>50</sub> VERO ± DE (μM)	IC <sub>50</sub> <i>T. cruzi</i> ± DE (μM)	IS
CTZ	37,1 ± 7,6	10,20 ± 0,47	3,6
KTZ	>96	89,00 ± 19,20	>1,0
phen	50,2 ± 18,7	4,04 ± 0,26	12,4
aminophen	29,9 ± 4,3	1,81 ± 0,55	16,5
tmp	51,9 ± 10,2	6,10 ± 2,77	8,5
bipy	81,3 ± 14,0	9,66 ± 0,23	8,4
dmb	95,2 ± 17,0	26,2 ± 8,8	3,7
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (phen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	3,2 ± 0,2	1,28 ± 0,12	2,5
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (aminophen)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	12,8 ± 2,2	2,79 ± 0,57	4,2
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	5,1 ± 1,6	0,61 ± 0,18	8,4
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (bipy)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	6,5 ± 1,1	1,11 ± 0,10	5,8
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (dmb)(CTZ)](PF <sub>6</sub> )	14,0 ± 4,3	2,26 ± 0,11	6,2
[Re(I)(CO) <sub>3</sub> (tmp)(KTZ)](PF <sub>6</sub> )*	>96	>96	ND
Nifurtimox	>100	20,10 ± 2,	49,6

\*Compuesto altamente insoluble, no fue posible realizar el ensayo en condiciones adecuadas por dicho problema. Se informan como ND (no determinado).

Estos resultados, por ser en la forma infectiva del parásito, son más representativos de la capacidad de los compuestos como potenciales fármacos. Se incluyó el complejo con el ligando Ketoconazol, pero debido a que la solubilidad de este compuesto era extremadamente baja en los disolventes utilizados, no pudo ser determinada mediante este método. Cabe destacar que para este ensayo se utilizaron células mamíferas tipo VERO, que son una mejor representación de las células sanas de un organismo infectado.

Como se muestra en las Tablas 19 y 20, la complejación de CTZ al centro *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(NN)] condujo a una disminución en el valor de IC<sub>50</sub> en un orden de magnitud en comparación con el ligando CTZ libre, lo que se interpreta como una mejora en la actividad antiparasitaria. Este efecto se observó en ambas formas del parásito, tanto epimastigota como tripomastigota.

Todos los complejos mostraron actividad en el rango micromolar en todos los casos, excepto para el compuesto con aminophen, y la misma fue superior a la de sus respectivos ligandos

bioactivos libres (a menor valor de  $IC_{50}$  mayor actividad). Para los compuestos con tmp, bipy y dmb el aumento de la actividad fue notorio, siendo de casi un orden de magnitud. Asimismo, cabe destacar que dichas actividades fueron del mismo orden que las obtenidas para el fármaco de referencia Nifurtimox, superándola en todos los casos.

Por otra parte, la selectividad hacia el parásito no mejoró a través de la generación de los compuestos *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(NN)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) con respecto a la del ligando CTZ libre, siendo inferior a la del Nifurtimox.

### 3.7 Mecanismo de acción

#### 3.7.1 Inhibición de la biosíntesis del ergosterol

La biosíntesis de ergosterol en *T. cruzi* [33] ha sido validada como un blanco quimioterapéutico en varios pasos de su vía, incluyendo la acción a nivel de las enzimas escualeno-2,3-epoxidasa (cataliza la conversión de escualeno a 2,3-oxidoescualeno), lanosterol sintasa (cataliza la conversión de 2,3-oxidoescualeno a lanosterol), lanosterol desmetilasa (cataliza conversión de lanosterol a 4,4-dimetil-5 $\alpha$ -colest-8,14,24, trien-3- $\beta$ -ol) entre otras [32-33]. En este sentido, se evaluaron los niveles de ergosterol, lanosterol y escualeno en parásitos control y parásitos incubados con el compuesto mas prometedor *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) con el fin de establecer potenciales blancos de acción a nivel de esta ruta biosintética.

La terbinafina, es un reconocido agente antimicótico de amplio espectro capaz de inhibir la biosíntesis de ergosterol, inhibiendo la actividad de la enzima escualeno-2,3-epoxidasa, pero también la de la lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa, lo que lleva a la acumulación tanto de escualeno como de lanosterol [33]. Como se puede observar en la Tabla 21, los parásitos tratados con el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) también fueron capaces de acumular escualeno y lanosterol con la consiguiente disminución de los niveles de ergosterol. La capacidad de acumulación de escualeno y lanosterol, cuando el parásito se incubó a una concentración de  $5 \times IC_{50}$ , fue ligeramente inferior a la observada para el fármaco Terbinafina. En todos los casos, la concentración de ergosterol fue inferior a los valores de los parásitos no tratados, siendo la depleción promovida por Terbinafina la más

alta. Este hecho podría indicar algunas diferencias en el mecanismo de acción entre el compuesto estudiado y la Terbinafina. El hecho de que el lanosterol se acumule en mayor proporción podría ser un indicador de que el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) poseería principalmente capacidad inhibitoria a nivel de la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa, como fuera reportado previamente en la literatura para el clotrimazol [34]. La inhibición de esta enzima dependiente del citocromo P-450, que convierte el lanosterol en ergosterol, daría lugar a una pared celular inestable en el parásito y provocaría una filtración de la membrana. Además, el hecho de que la depleción de ergosterol sea mayor para el complejo estudiado, en comparación con el clotrimazol libre, indica que el complejo presenta una actividad inhibitoria mayor que el ligando correspondiente, tal como se muestra en las Tablas 21 y 22.

**Tabla 21. Resultados de la cuantificación de escualeno, lanosterol y ergosterol en epimastigotas de *T. cruzi* tras 4 h de incubación con *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>).**

Esterol	CN	Compuesto 1×			Compuesto 5×			Terbinafina		
	C (μM)	C (μM)	A (%)	D (%)	C (μM)	A (%)	D (%)	C (μM)	A (%)	D (%)
Ergosterol	10,92	8,42	---	22,8	7,87	---	27,9	6,61	---	39,6
Lanosterol	6,07	7,10	16,9	---	7,99	31,7	---	8,62	42,2	---
Escualeno	11,35	12,00	5,8	---	12,29	8,4	---	12,83	13,0	---

CN: control negativo; A(%): porcentaje de acumulación; D(%): porcentaje de depleción.

**Tabla 22. Resultados de la cuantificación de escualeno, lanosterol y ergosterol en epimastigotes de *T. cruzi* tras 4 h de incubación con CTZ.**

Esterol	Clotrimazol 1×			Clotrimazol 5×		
	C (μM)	A (%)	D (%)	C (μM)	A (%)	D (%)
Ergosterol	8,82	---	19,2	8,19	---	24,9
Lanosterol	6,98	15,0	---	7,83	28,9	---
Escualeno	11,71	3,2	---	12,10	6,7	---

A(%): Porcentaje de acumulación; D(%): Porcentaje de depleción.

### 3.7.2 Interacción con lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa: acoplamiento molecular

Según la evidencia experimental, el complejo  $fac-[Re(I)(CO)_3(tmp)(CTZ)]^+$  presentó capacidad inhibidora frente a la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa de *T. cruzi* (CYP51). Para proporcionar una mayor comprensión del mecanismo de acción, se procedió a realizar cálculos de acoplamiento molecular de este complejo y CTZ, empleando CYP51 como receptor [35]. Estos estudios fueron realizados por el Dr. Nicolás Veiga del Área Química Inorgánica, Facultad de Química, UdelaR.

Tal como se puede apreciar en el Anexo – Publicaciones, se observó que la molécula de CTZ se une al grupo hemo, que constituye el sitio activo de la enzima, a través de un enlace de coordinación con el anillo de imidazol. La orientación específica dentro del sitio activo está fijada por numerosas interacciones, en su mayoría hidrofóbicas. Globalmente, estas interacciones lipofílicas son más débiles que las encontradas para  $fac-[Re(I)(CO)_3(tmp)(CTZ)]^+$ , dando lugar a una disminución de 21,4 kJ/mol en el  $\Delta G_{unión}$  estimado de CTZ al correspondiente complejo de Re(I). La mayor afinidad por el receptor exhibida por  $fac-[Re(I)(CO)_3(tmp)(CTZ)]^+$  brinda una explicación factible de su mayor capacidad inhibitoria en comparación con el ligando CTZ libre.

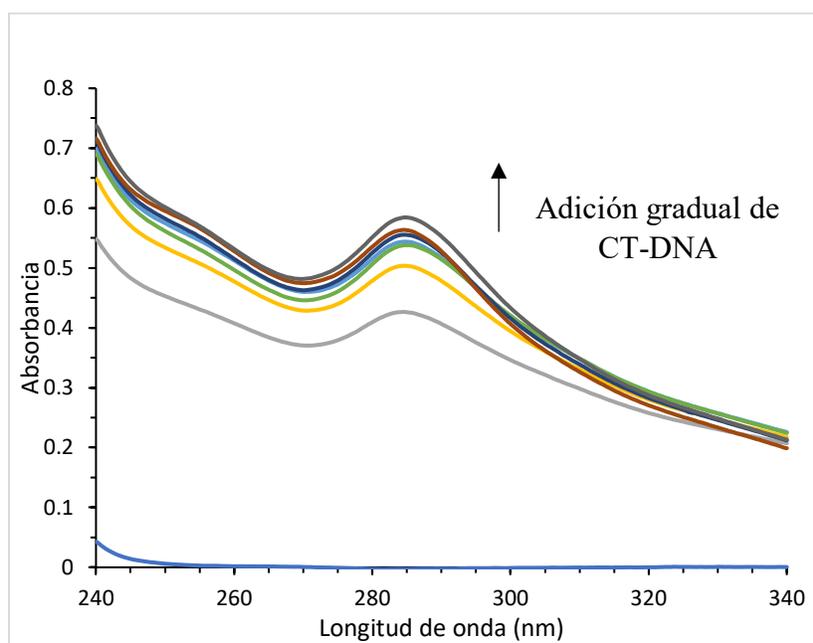
### 3.7.3 Resultados de la interacción de los compuestos con ADN

Para los ensayos de interacción con ADN se emplearon experimentos de espectrometría de absorción electrónica para analizar la interacción (unión) de los complejos con CT-DNA. La misma se evaluó monitoreando los cambios en los espectros electrónicos mientras aumentaba la concentración de CT-DNA. Tras la adición de ADN, se observó un ligero hipercromismo en la región UV (270-320 nm), tal como se observa en la Figura 24.

De acuerdo con la literatura, un efecto hipercrómico surge principalmente debido a la presencia de cationes cargados que interactúan con el ADN a través de la atracción electrostática de los grupos fosfato del esqueleto del ADN, lo que provoca una contracción y un daño general en la estructura secundaria del ADN. El efecto también puede atribuirse al contacto externo (unión electrostática) o al desenrollamiento parcial de la estructura helicoidal del ADN, exponiendo más bases del ADN.

Por otro lado, los compuestos que se unen al ADN a través de la intercalación con sus bases suelen mostrar efectos hipocrómicos y batocrómicos cuando la concentración de ADN aumenta.

Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en estudios preliminares realizados con el compuesto más activo *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), en los que se midió la disminución de la fluorescencia propia del aducto bromuro de etidio-ADN por desplazamiento de bromuro de etidio como resultado de la interacción del compuesto con el ADN. En esos estudios solo se observó una débil interacción. De todas formas, los resultados de estos estudios preliminares no permitieron establecer la intercalación como un mecanismo de acción de relevancia en los compuestos desarrollados [35]. En conclusión, los resultados de ambas técnicas parecen indicar que los nuevos complejos no muestran una significativa interacción intercalante con esta biomolécula, sino que interactúan a través de otro mecanismo.



**Figura 24.** Espectros de absorción electrónica de *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en ausencia (línea gris) y en presencia (líneas de color) de CT-DNA. La flecha muestra los cambios tras la adición de una cantidad creciente de CT-DNA. (CT-DNA = 0-20 μM, complejo C = 10 μM, muestras preparadas en medio DMSO/buffer Tris HCl, pH 7,4).

### 3.7.4 Acoplamiento molecular con ADN

Tomando en consideración los resultados de los estudios experimentales de interacción con ADN, se realizaron cálculos de acoplamiento molecular con el objetivo de dilucidar los aspectos estructurales detrás de la unión de los compuestos a ADN. Estos estudios fueron realizados por el Dr. Nicolás Veiga del Área Química Inorgánica, Facultad de Química UdelaR. Los resultados reportados en el Anexo – Publicaciones sugieren una interacción en la que los complejos no tienen una posición de anclaje significativamente preferida, aunque el sitio de unión siempre se encuentra en el surco mayor del ADN.

Teniendo en cuenta la mejor posición de acoplamiento en cada caso, se observó que los cinco complejos  $fac-[Re(I)(CO)_3(NN)(CTZ)]^+$  se unieron al CT-DNA con una afinidad similar. Se encontró que cuando el NN es phen, bipy, dmb o tmp, los complejos encajan en el surco mayor del ADN al establecer enlaces de hidrógeno convencionales y C-H con citosina y el esqueleto de azúcar-fosfato usando los ligandos carbonilo (Figura 25). La posición de acoplamiento se estabiliza aún más por las interacciones  $\pi$ -sigma establecidas entre los anillos de fenilo CTZ y la timina. En el caso de  $fac-[Re(I)(CO)_3(\text{aminophen})(CTZ)]^+$ , el modo de unión es ligeramente diferente. El grupo amino del ligando NN establece un fuerte enlace de hidrógeno N-H $\cdots$ O con el esqueleto de fosfato. Los ligandos carbonilo se dirigen a la base de nucleótidos, estabilizados por la formación de enlaces H con adenina y el esqueleto de azúcar-fosfato. Finalmente, la posición de acoplamiento se asegura mediante el establecimiento de una interacción CTZ-thymine  $\pi$ -sigma.

La información estructural sobre los modos de unión de los complejos brindó evidencia adicional para racionalizar el hipercromismo observado durante los estudios de unión al ADN. Es factible que los complejos catiónicos se acerquen a la molécula de ADN, encajando en el surco mayor al establecer enlaces de hidrógeno e interacciones  $\pi$ -sigma con las bases de nucleótidos y el esqueleto de fosfato-azúcar, lo que conduce a una distorsión concomitante de la estructura secundaria del ADN.

Para ambos complejos se puede observar en la Figura 25 las representaciones de los acoplamientos a ADN y las interacciones correspondientes.

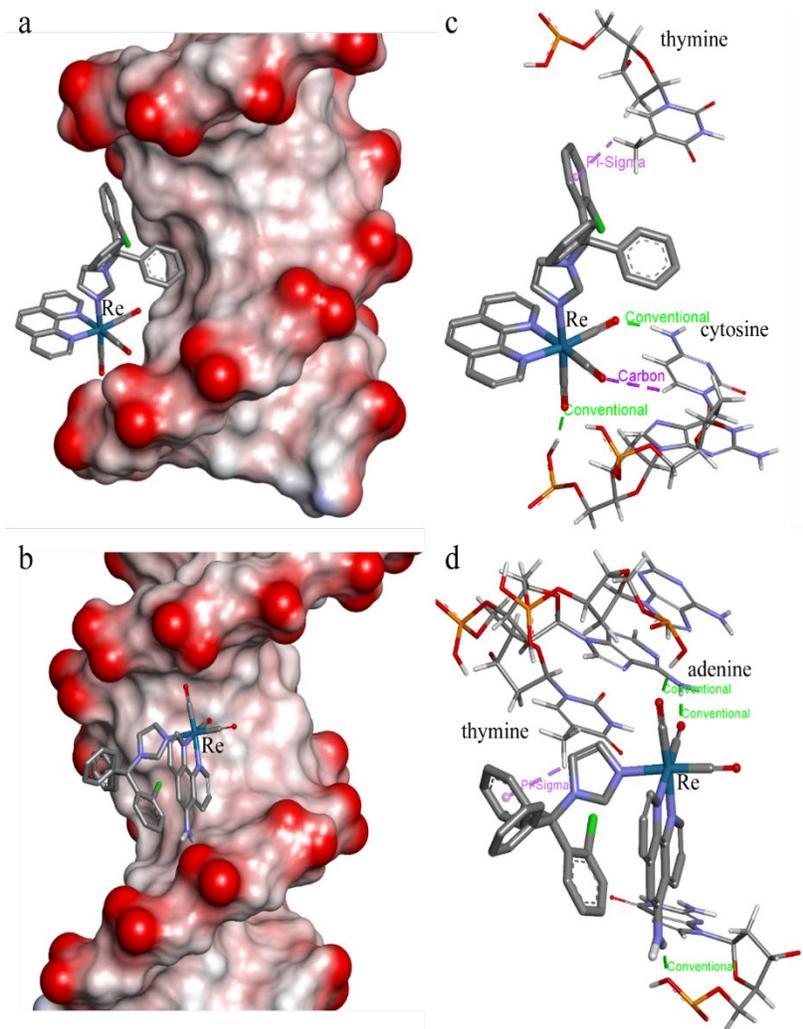


Figura 25. Modelo de *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)]<sup>+</sup> (a) y *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)]<sup>+</sup> (b) acoplado en el surco mayor de CT-DNA. En (c) y (d), las interacciones intermoleculares entre el sustrato y el CT-DNA se muestran para (a) y (b), respectivamente. Pi-sigma = interacción C-H- $\pi$ ; conventional = enlace de H convencional; Carbon = enlace de H C-H. Código de color del átomo: C (gris), N (azul), O (rojo), Cl (verde), H (blanco).

### 3.8 Estudios de metalómica

#### 3.8.1 Estudios de metalómica mediante espectrometría atómica

Como parte de los estudios de metalómica, se trabajó en el desarrollo de una metodología analítica novedosa para la determinación de renio, que permitiera evaluar el porcentaje de renio captado por los parásitos y la asociación de éste con biomacromoléculas de interés.

### 3.8.1.1 Estudios de renio captado por epimastigotas de *T. cruzi*

De todos los complejos previamente evaluados *in vitro* contra epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa CL Brener, el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) resultó ser el más activo. Por lo tanto, fue seleccionado para los estudios de metalómica, incubándose en presencia de los parásitos durante 4 y 24 h a concentraciones de 1× y 10× el valor de IC<sub>50</sub> previamente calculado (3,43 μmol L<sup>-1</sup> y 34,3 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente). La cantidad de renio captado por los parásitos o fuertemente ligado (no eliminable por lavado) y el renio remanente en el medio de cultivo, fueron determinados mediante MP-AES. La concentración promedio de renio determinado para tres experimentos independientes se muestra en la Tabla 23. Para evaluar la veracidad de este ensayo, se calculó el balance de masa correspondiente para verificar que la masa de renio en el pellet + la masa de renio en el cultivo, fuera estadísticamente equivalente a la masa total de renio utilizado para la incubación. Para esta tarea se realizó una prueba *t* de Student (*p* < 0,05), mostrando valores *t* experimentales por debajo del valor *t* teórico. De esta forma, se concluyó que la suma de las masas experimentales obtenidas por MP-AES eran estadísticamente iguales a las masas teóricas utilizadas para la incubación.

Como se presenta en la Tabla 23, los porcentajes de incorporación del metal no cambiaron significativamente entre 4 y 24 h. Los porcentajes de captación fueron bastante bajos en comparación con los informados previamente para compuestos de vanadio sintetizados por nuestro grupo de investigación en epimastigotas de *T. cruzi* [37-38]. Esta captación diferencial podría surgir de la diferente naturaleza química de los compuestos y los diferentes centros metálicos.

**Tabla 23. Porcentajes de renio captado por los parásitos después de 4 h y 24 h de incubación con 1× y 10× la IC<sub>50</sub> calculado para *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) sobre epimastigotas de *T. cruzi*.**

Concentración de compuesto (μM)	% Entrada ± DE	
	4 h	24 h
1 × IC <sub>50</sub>	1,24 ± 0,03	1,16 ± 0,04
10 × IC <sub>50</sub>	1,28 ± 0,03	1,25 ± 0,02

% Entrada corresponde al % de renio captado por el parásito (pellet) en relación con el renio total. Se presenta el promedio de tres réplicas independientes y la desviación estándar (DE).

### 3.8.1.2 Distribución subcelular de renio en epimastigotas de *T. cruzi*

Se estudió la asociación de renio con biomacromoléculas de interés de forma de evaluar la distribución subcelular del compuesto más promisorio *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) dentro de los parásitos. Para esta tarea, los epimastigotas de *T. cruzi* se incubaron durante 4 h con el compuesto elegido. Posteriormente, se aislaron diferentes biomacromoléculas (ADN, ARN, proteínas solubles y fracción insoluble), y el renio total asociado a cada fracción fue determinado mediante MP-AES. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

Se observó un patrón similar de distribución de renio en epimastigotas después de 4 h de tratamiento con 1 × y 10 × el valor IC<sub>50</sub> (3,43 μmol L<sup>-1</sup>) determinado previamente en epimastigotas de *T. cruzi*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la incubación con diferentes concentraciones de compuesto de acuerdo con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba *t* de Student (*p* < 0,05).

**Tabla 24. Porcentaje de renio asociado a las diferentes biomacromoléculas aisladas tras 4 h de tratamiento con 1 × y 10 × la IC<sub>50</sub> calculada de *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) en epimastigotas de *T. cruzi*.**

Concentración de compuestos (μM)	% asociación ± DE			
	PS	FI	ADN	ARN
1 × IC <sub>50</sub>	82,1 ± 0,8	16,3 ± 0,7	0,85 ± 0,05	0,76 ± 0,07
10 × IC <sub>50</sub>	83,5 ± 0,3	15,0 ± 0,2	0,81 ± 0,03	0,69 ± 0,06

% asociación corresponde al % de renio asociado a la fracción relativa al renio total captada por el parásito.

Se presentan el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar (DE) para cada fracción: ADN, ARN, proteínas solubles (PS) y fracción insoluble (FI).

Como se puede observar en la Tabla 24, menos del 1% se encontró asociado a fracciones de ácidos nucleicos (ADN y ARN) a ambos niveles de concentración. Asimismo, se observó una asociación preferencial con la fracción de proteínas solubles con un valor promedio de 82,8%. Asociaciones preferenciales de esta magnitud con proteínas solubles fueron informadas previamente por nuestro grupo de investigación para complejos heterolépticos de oxovanadio (V) [37-38].

### 3.8.2 Microscopía Raman confocal

La microscopía Raman confocal es un método muy poderoso para el estudio de células individuales, pues combina especificidad molecular con resolución en el rango submicrométrico. Es de gran utilidad adquirir espectros Raman no sólo en un punto individual dentro de la célula, sino que en múltiples puntos dentro del célula o bien en toda la célula en su conjunto, de forma de obtener mayor cantidad de información [39].

Tal como se describió en la sección anterior, luego de los estudios metalómicos mediante MP-AES, se observó que el compuesto *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) mostraba una asociación preferencial con la fracción de proteínas solubles del parásito y una baja asociación con las fracciones de ácidos nucleicos ADN y ARN, lo cual sugirió descartar estas biomoléculas como principales dianas.

En este sentido, de forma de profundizar en la localización del compuesto captado en todo el parásito, se utilizó microscopía Raman confocal como una segunda herramienta complementaria para realizar un estudio metalómico indirecto. De acuerdo con la literatura, las señales en el rango de  $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  corresponden al modo de estiramiento C=O (proteínas y ADN, Figura 26 región roja), las señales en el rango de  $1425/1475\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las deformaciones antisimétricas de metilo/metileno CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> (lípidos, Figura 26 región azul) y señales en el rango de  $1570/1580\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los modos de estiramiento C=C en bases de purina (ADN/ARN, Figura 26 región roja). Además, la señal a  $1594\text{ cm}^{-1}$  observada en la Figura 26 (región verde) podría atribuirse al ADN en mayor concentración. Sobre esta base, la etiqueta roja y verde corresponden al ADN mitocondrial y nuclear, mientras que la etiqueta azul corresponde a los lípidos de la membrana.

Las bandas principales del compuesto tricarbonilo de Re(I) muestran un fuerte solapamiento con las señales provenientes de lípidos, proteínas y ADN y, debido a su baja concentración en el parásito, las señales asociadas a los modos de estiramiento de  $\nu(\text{CO})$  no son tan pronunciadas en espectroscopía Raman como para ser detectadas en estos experimentos. Por lo tanto, se puso el foco sobre los principales cambios que ocurren en los parásitos tratados en relación con los parásitos control sin tratar.

Cabe señalar que las determinaciones de renio realizadas previamente mediante MP-AES, en particular de la asociación de renio al ADN del parásito, se realizaron luego de procesos de extracción y purificación de esta biomolécula. Por lo tanto, la cantidad de metal determinada por esta MP-AES corresponde únicamente a la fracción fuertemente unida a la biomolécula. No obstante, la superposición encontrada por espectroscopía Raman proporcionó una pista sobre la ubicación real del compuesto dentro del parásito. Comparando las imágenes Raman obtenidas para parásitos tratados con una concentración de  $1 \times IC_{50}$  durante 4 y 24 h de incubación, y las imágenes de los parásitos control sin tratar (Figura 26), se pudo observar que las señales asociadas al ADN sufren cambios importantes en su localización a lo largo del parásito, indicando una posible débil interacción con el compuesto como se mostró previamente en la Sección 3.7.3.

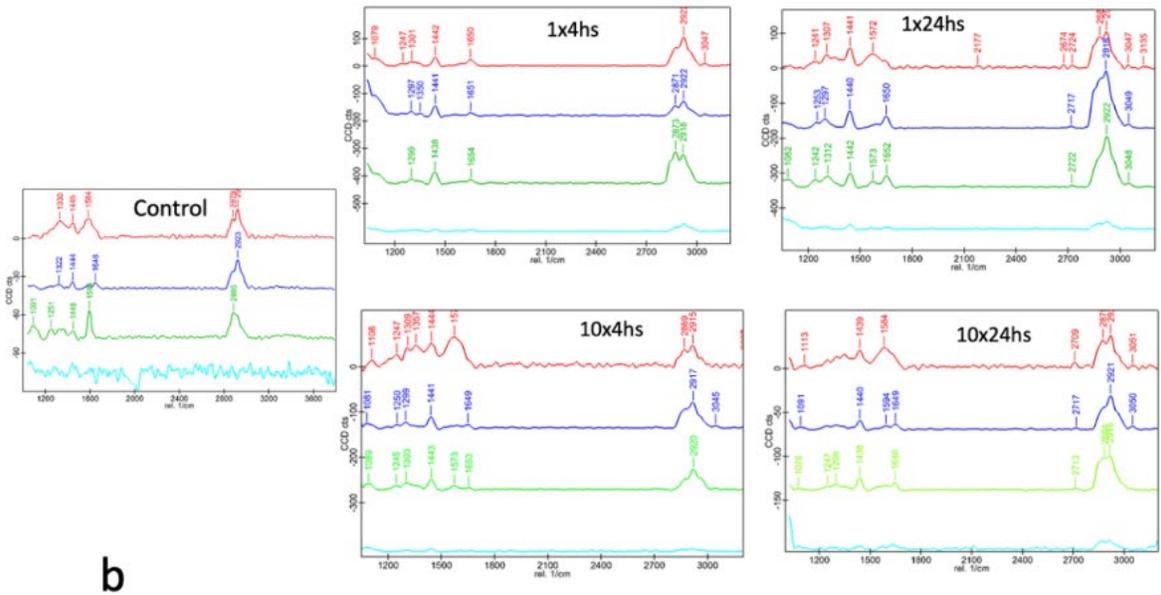
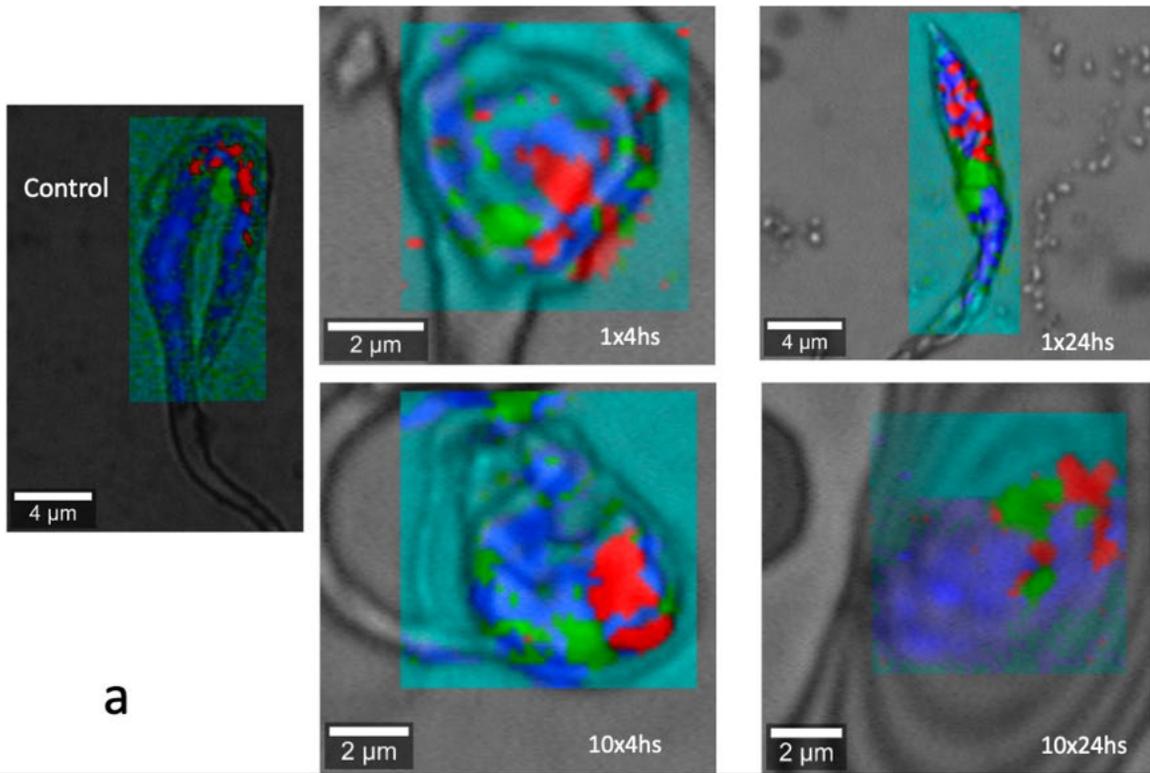


Figura 26. a) Superposición entre imágenes Raman ópticas y confocales obtenidas del análisis de componentes principales seleccionados para muestras: control,  $1 \times IC_{50}$  4 h,  $1 \times IC_{50}$  24 h,  $10 \times IC_{50}$  4 h y  $10 \times IC_{50}$  24 h. b) Espectros Raman promedio para cada componente, correspondientes a las imágenes Raman confocales presentadas en (a).

### 3.9 Referencias

- [1] Fadeeva, V.P., Tikhova, V.D., Nikulicheva, O.N. (2008). Elemental analysis of organic compounds with the use of automated CHNS analyzers. *Journal of Analytical Chemistry*, 63, 1094–1106.
- [2] Machado, I., Fernández, S., Becco, L., Garat, B., Gancheff, J. S., Rey, A., Gambino, D. (2014). New *fac*-tricarbonyl rhenium(I) semicarbazone complexes: synthesis, characterization, and biological evaluation. *Journal of Coordination Chemistry*, 67(10), 1835–1850.
- [3] Li, X., Zhang, D., Lu, G., Xiao, G., Chi, H., Dong, Y., Zhang, Z., Hu, Z. (2012). Synthesis and characterization of novel rhenium (I) complexes with large Stokes shift for applications in organic electroluminescent devices. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 241, 1–7.
- [4] Martínez, A., Carreon, T., Iniguez, E., Anzellotti, A., Sánchez, A., Tyan, M., Sattler, A., Herrera, L., Maldonado, R.A., Sánchez-Delgado, R.A. (2012). Searching for new chemotherapies for tropical diseases: Ruthenium–clotrimazole complexes display high *in vitro* activity against leishmania major and *trypanosoma cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(8), 3867–3877.
- [5] Tsaryuk, V., Zolin, V., Puntus, L., Savchenko, V., Legendziewicz, J., Sokolnicki, J., Szostak, R. (2000). Vibronic spectra and details of the structure of europium nitrates with derivatives of 1,10-phenanthroline. *Journal of Alloys and Compounds*, 300–301, 184–192.
- [6] Betanzos-Lara, S., Gómez-Ruiz, C., Barrón-Sosa, L.R., Gracia-Mora, I., Flores-Álamo, M., Barba-Behrens, N. (2012). Cytotoxic copper(II), cobalt(II), zinc(II), and nickel(II) coordination compounds of clotrimazole. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 114, 82–93.
- [7] Singh, S.S. (1969). Infrared spectra of 1:10 phenanthroline and its addition compounds with antimony trichloride and antimony pentachloride. *Zeitschrift Für Naturforschung A*, 24(12), 2015–2016.

- [8] Van der Drift, R.C., Sprengers, J. W., Bouwman, E., Mul, W.P., Kooijman, H., Spek, A.L., Drent, E. (2002). Ruthenium-catalyzed isomerization of allylic alcohols: Oxidation state determines resistance against diene inhibition. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2002(8), 2147–2155.
- [9] Heyns, A.M. (1977). The IR and Raman spectra of sodium hexafluorophosphate monohydrate,  $\text{NaPF}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . *Spectrochimica Acta Part A – Molecular Spectroscopy*, 33(3-4), 315–322.
- [10] Rodríguez Arce, E., Sarniguet, C., Moraes, T.S., Vieites, M., Tomaz, A.I., Medeiros, A., Comini, M.A., Varela, J., Cerecetto, H., González, M., Marques, F., García, M.H., Otero, L., Gambino, D. (2015). A new ruthenium cyclopentadienyl azole compound with activity on tumor cell lines and trypanosomatid parasites. *Journal of Coordination Chemistry*, 68(16), 2923–2937.
- [11] Sánchez-Delgado, R.A., Navarro, M., Lazard, K., Atencio, R., Capparelli, M., Vargas, F., Urbina, J.A., Bouillez, A., Noels, A.F., Masi, D. (1998). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. Synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. *Inorganica Chimica Acta*, 275–276, 528–540.
- [12] Evdokimova, O.V., Pechishcheva, N.V., Shunyaev, K.Y. (2012). Up-to-date methods for the determination of rhenium. *Journal of Analytical Chemistry*, 67(9), 741–753.
- [13] Machado, I., Dol, I., Rodríguez-Arce, E., Cesio, M.V., Pistón, M. (2016). Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). *Microchemical Journal*, 128, 128–133.
- [14] Welz, B., Sperling, M. (1999). *Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany.
- [15] São Bernardo Carvalho, L., Santos Silva, C., Araújo Nóbrega, J., Santos Boa Morte, E., Muniz Batista Santos, D.C., Andrade Korn, M.G. (2020). Microwave induced plasma optical emission spectrometry for multielement determination in instant soups. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103376.

- [16] Williams, C.B., Jones, B.T., Donati, G.L., Amais, R.S., Fontoura, B.M., Nóbrega, J.A. (2019). Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument. *Trends in Analytical Chemistry*, 116, 151–157.
- [17] Pistón, M., Suárez, A., Bühl, V., Tissot, F., Silva, J., Panizzolo, L. (2020). Influence of cooking processes on Cu, Fe, Mn, Ni, and Zn levels in beef cuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 94, 103624.
- [18] Corrales Escobosa, A.R., Wrobel, K., Yanez Barrientos, E., Jaramillo Ortiz, S., Ramirez Segovia, A.S., Wrobel, K. (2014). Effect of different glycation agents on Cu(II) binding to human serum albumin, studied by liquid chromatography, nitrogen microwave-plasma atomic-emission spectrometry, inductively-coupled-plasma mass spectrometry, and high-resolution molecular-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(4), 1149–1157.
- [19] Balaram, V. (2020). Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) and its applications – A critical review. *Microchemical Journal*, 159, 105483.
- [20] Koide, M., Hodge, V., Yang, J.S., Goldberg, E.D. (1987). Determination of rhenium in marine waters and sediments by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry*, 59(14), 1802–1805.
- [21] Eurachem, Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics. <http://www.eurachem.org>, 2014 (consultada 21/04/2022)
- [22] Miller J.N., Miller J.C. (2010). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, sixth ed., Ashford Colour Press Ltd., Gosport.
- [23] Du, C.M., Valko, K., Bevan, C., Reynolds, D., Abraham, M.H. (1998). Rapid gradient RP-HPLC method for lipophilicity determination: a solvation equation-based comparison with isocratic methods. *Analytical Chemistry*, 70(20), 4228–4234.
- [24] Starek, M., Plenis, A., Zagrobelna, M., Dąbrowska, M. (2021). Assessment of lipophilicity descriptors of selected NSAIDs obtained at different TLC stationary phases. *Pharmaceutics*, 13(4), 440–459.

- [25] Liu, X., Testa, B., Fahr, A. (2010). Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. *Pharmaceutical Research*, 28(5), 962–977.
- [26] Kerns, E.H., Di, L. (2008). Lipophilicity. In: *Drug-like properties: Concept, structure design and methods, from ADME to toxicity optimization*. Elsevier: London, UK.
- [27] Pliska, V., Testa, B., Van De Waterbeemd, H., Mannhold, R. (1996) Lipophilicity in drug action and toxicology. In: *Methods and principles in Medicinal Chemistry*. VCH Publishers: Weinheim, Germany.
- [28] Bate-Smith, E.C., Westall, R.G. (1950). Chromatographic behavior and chemical structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4, 427–440.
- [29] Keller, S., Ong, Y. C., Lin, Y., Cariou, K., Gasser, G. (2020). A tutorial for the assessment of the stability of organometallic complexes in biological media. *Journal of Organometallic Chemistry*, 906, 121059.
- [30] Reed, G.A. (2016). Stability of drugs, drug candidates, and metabolites in blood and plasma. *Current Protocols in Pharmacology*, 75, 7.6.1–7.6.12.
- [31] Tyler, K.M., Olson, C.L., Engman, D.M. (2003). The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *American Trypanosomiasis*. Springer: New York, USA.
- [32] Gerpe, A., Álvarez, G., Benítez, D., Boiani, L., Quiroga, M., Hernández, P., Sortino, M., Zacchino, S., González, M., Cerecetto, H. (2009). 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 17(21), 7500–7509.
- [33] Santivañez-Veliz, M., Moreno-Viguri, E., Pérez-Silanes, S., Varela, J., Cerecetto, H., González, M., Lizarraga, E. (2017). Development, validation, and application of a GC–MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Chromatography B*, 1061–1062, 225–232.
- [34] Buckner, F.S., Urbina, J.A. (2012). Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 236–242.
- [35] Chen, C.K., Leung, S.S.F., Guilbert, C., Jacobson, M.P., McKerrow, J.H., Podust, L.M. (2010). Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma*

- brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. PLoS Neglected Tropical Diseases, 4(4), e651.
- [36] Rivas, F., Mármol, C., Scalese, G., Perez-Diaz, L., Machado, I., Blacque, O., Medeiros, A., Comini, M., Gambino, D. (2022). New multifunctional Ru(II) organometallic compounds show activity against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania infantum*. Journal of Inorganic Biochemistry, 237, 112016.
- [37] Scalese, G., Machado, I., Fontana, C., Risi, G., Salinas, G., Pérez-Díaz, L., Gambino, D. (2018). New heteroleptic oxidovanadium(V) complexes: synthesis, characterization, and biological evaluation as potential agents against *Trypanosoma cruzi*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 23, 1265–1281.
- [38] Scalese, G., Machado, I., Correia, I., Pessoa, J. C., Bilbao, L., Perez, L., Gambino, D. (2019). Exploring oxidovanadium (IV) homoleptic complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives as prospective antitrypanosomal agents. New Journal of Chemistry, 43, 17756.
- [39] Schie, I. W., Huser, T. (2013). Methods and applications of Raman microspectroscopy to single-cell analysis. Applied Spectroscopy, 67(8), 813–828.

# **CAPÍTULO 4**

## **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

## 4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 4.1 Conclusiones

En este trabajo se sintetizaron seis nuevos tricarbonilos multifuncionales de Re(I) con ligandos bioactivos para expandir el estudio de nuevos compuestos organometálicos como potenciales agentes contra *T. cruzi* y explorar la potencialidad de los tricarbonilos de Re(I) en este sentido. Los ligandos bioactivos utilizados fueron derivados de la 1,10-fenantrolina (NN) y un azol (clotrimazol o ketoconazol), dando lugar a compuestos de fórmula general  $fac-[Re(I)(CO)_3(NN)(azol)](PF_6)$ . Los compuestos fueron caracterizados completamente en estado sólido y en solución. Asimismo, se estudió la actividad de éstos en epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi*. Los compuestos con clotrimazol mostraron una alta actividad contra la forma infectiva del parásito (tripomastigota) con valores  $IC_{50}$  en el rango micromolar bajo y valores de índice de selectividad de moderados a buenos, ensayados en células VERO como modelo de células de mamífero. La inclusión de los dos ligandos bioactivos en una sola molécula condujo a compuestos que en su mayoría resultaron más activos que los respectivos ligandos libres. Esto demuestra que la lógica de ensamblaje o hibridación aplicada para diseñar los compuestos de Re(I) resultó exitosa. Los compuestos fueron estables en diferentes medios biológicamente relevantes, particularmente durante al menos 24 h en medio BHI suplementado y en plasma humano. Los compuestos resultaron más lipofílicos que los ligandos bioactivos libres, pero no se observó una clara correlación entre la actividad antitripanosómica y la lipofilia. Para sacar conclusiones en este sentido parece necesario disponer de un mayor número de compuestos estructuralmente relacionados. Para evaluar la localización del compuesto más promisorio dentro del parásito, se realizaron dos estudios metalómicos complementarios, uno mediante microscopía Raman confocal y otro mediante espectrometría de emisión atómica por plasma de microondas. Dada la baja intensidad en el espectro Raman de los estiramientos de los tricarbonilos no se pudo asegurar la localización del complejo en los parásitos mediante microscopía Raman, pero igualmente esta técnica proporcionó importantes indicios sobre una interacción débil con el ADN. Por otro lado, los estudios mediante

espectrometría de emisión atómica demostraron una baja captación de renio por parte de los parásitos y una asociación preferencial del compuesto ensayado con las proteínas solubles, así como una baja asociación con el ADN (en forma complementaria a lo observado por Raman). Para desentrañar el mecanismo de acción de los compuestos se estudiaron experimental y teóricamente dos blancos potenciales descritos para los ligandos libres: el ADN y una de las enzimas implicadas en la vía biosintética del ergosterol, CYP51 (lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa). Se encontró que los compuestos multifuncionales desarrollados comparten (*in vitro*) mecanismos de acción similares al descrito para los ligandos bioactivos individuales incluidos en las nuevas entidades químicas. El conjunto completo de resultados demostró la potencialidad de estos nuevos tricarbonilos Re(I) como candidatos prometedores para el desarrollo de fármacos antitripanosoma.

Como parte fundamental del trabajo, se optimizaron y validaron varios métodos analíticos, incluyendo un método donde se aplicó la técnica de espectrometría de emisión atómica por plasma de microondas, la cual no había sido reportada aún en la literatura científica para dicho propósito. De esta forma, se destaca el aporte tecnológico de este trabajo de tesis, que proporciona una nueva herramienta para futuras investigaciones. El método analítico validado para las determinaciones de renio puede considerarse como una alternativa confiable, económica y ecológica para estudios metalómicos, constituyendo una estrategia muy eficiente para la realización de estudios bioanalíticos de compuestos bioactivos de renio.

A nivel personal, los aportes científicos relacionados con el tema en estudio y el trabajo experimental en si mismo, me han significado la incorporación de un importante caudal de conocimientos, herramientas y capacidades en el campo de la investigación. Asimismo, la experiencia adquirida en cuanto a síntesis, caracterización y evaluación de compuestos, diseño y desarrollo de métodos analíticos, e interpretación de resultados, me ha aportado una formación de invaluable valor para mi desarrollo profesional como investigador.

## 4.2 Perspectivas

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de tesis son prometedores y sientan base para seguir explorando complejos metálicos con ligandos bioactivos. Constituyen el punto de partida de estudios de complejos análogos, con centros metálicos de tricarbonilos con un metal alternativo como lo es el manganeso. El ion  $Mn(II)$  presenta características químicas tales que puede conformar tricarbonilos análogos, pero siendo éste un elemento esencial y que puede obtenerse con menores costos puede resultar de gran interés para el desarrollo de antiparasitarios. Los compuestos desarrollados podrán estudiarse además como potenciales antitumorales, dado la ya mencionada correlación entre los compuestos antiparasíticos y los antitumorales.

Asimismo, considerando los complejos inicialmente sintetizados, se plantea obtener a partir de los compuestos reportados en este trabajo de tesis, derivados de fórmula general  $fac-[Re(I)(CO)_3(NN)(azol)]Cl$ , luego de un intercambio de contraión. En este sentido, en el marco del grupo de investigación ya se han comenzado los ensayos preliminares de síntesis, caracterización y actividad biológica de estos compuestos contra *T. cruzi*, con resultados prometedores.

# **CÁPITULO 5**

## **ANEXO**

## 5 ANEXO

### 5.1 Presentaciones en eventos

Durante la realización de la maestría el trabajo realizado se ha presentado en diversas instancias:

- Se presentó un e-poster VII LATIN AMERICAN MEETING ON BIOLOGICAL INORGANIC CHEMISTRY, VII LABIC (realizado entre el 6 y el 9 de abril de 2021): Multi-target prospective antiparasitic organometallic compounds: Re(I) tricarbonyl complexes with two different bioactive ligands. Mariano Soba, Gonzalo Scalese, Nicolás Pérez, Federico Casuriaga, Leticia Pérez, Ignacio Machado, Dinorah Gambino.
- Se presentó un e-póster en el LatinXChem (congreso virtual llevado a cabo el 20 de septiembre de 2021 a través de la red social Twitter): Design of novel multi-target Re(I) tricarbonyls with antiparasitic activity. Mariano Soba, Gonzalo Scalese, Nicolás Pérez, Leticia Pérez-Díaz, Ignacio Machado, Dinorah Gambino.
- Se presentó un e-póster en el ENAQUI 7 (del 3 al 5 de noviembre de 2021): Diseño de compuestos organometálicos multi-blanco con actividad antiparasitaria: tricarbonilos de Re(I) con dos ligandos bioactivos diferentes. Mariano Soba, Gonzalo Scalese, Nicolás Pérez, Federico Casuriaga, Ricardo Faccio, Leticia Pérez, Ignacio Machado, Dinorah Gambino
- Se presentó un e-póster en el 8th Latin American Symposium on Coordination and Organometallic Chemistry (del 10 al 11 de marzo de 2022): Multi-functional Re(I) tricarbonyls for the treatment of Chagas Disease. Mariano Soba, Gonzalo Scalese, Nicolás Pérez, Federico Casuriaga, Ricardo Faccio, Leticia Pérez, Ignacio Machado, Dinorah Gambino.
- Se presentó poster en Metals in Medicine, Gordon Research Conference, Andover, USA (26 junio - 1 julio de 2022): Multi-functional organometallic compounds for the treatment of Chagas Disease: Re(I) tricarbonyl compounds with two different bioactive

ligands. Mariano Soba, Gonzalo Scalese, Ricardo Faccio, Nicolás Veiga, Leticia Pérez, Ignacio Machado, Dinorah Gambino. Presentación Dinorah Gambino.

- Se realizó una presentación oral en European Symposium on Analytical Spectrometry ESAS 2022 & 17th Czech - Slovak Spectroscopic Conference (4 – 9 de setiembre de 2022): Microwave plasma atomic emission spectrometry for metallomics of bioactive rhenium compounds. Mariano Soba, Gonzalo Scalese, Leticia Pérez-Díaz, Dinorah Gambino, Ignacio Machado. Presentación oral Ignacio Machado.

## 5.2 Publicaciones

- Soba M., Scalese G., Pérez-Díaz L., Gambino D., Machado I. (2022) Application of microwave plasma atomic emission spectrometry in bioanalytical chemistry of bioactive rhenium compounds. *Talanta* 244, 123413.
- Soba M., Scalese G., Casuriaga F., Pérez N., Veiga N., Echeverría G. A., Piro O. E., Faccio R., Pérez-Díaz L., Gasser G., Machado I., Gambino D. (2023) Multifunctional organometallic compounds for the treatment of Chagas disease: Re(I) tricarbonyl compounds with two different bioactive ligands. *Dalton Trans.* 52, 1623-1641.

### 5.3 Materiales complementarios

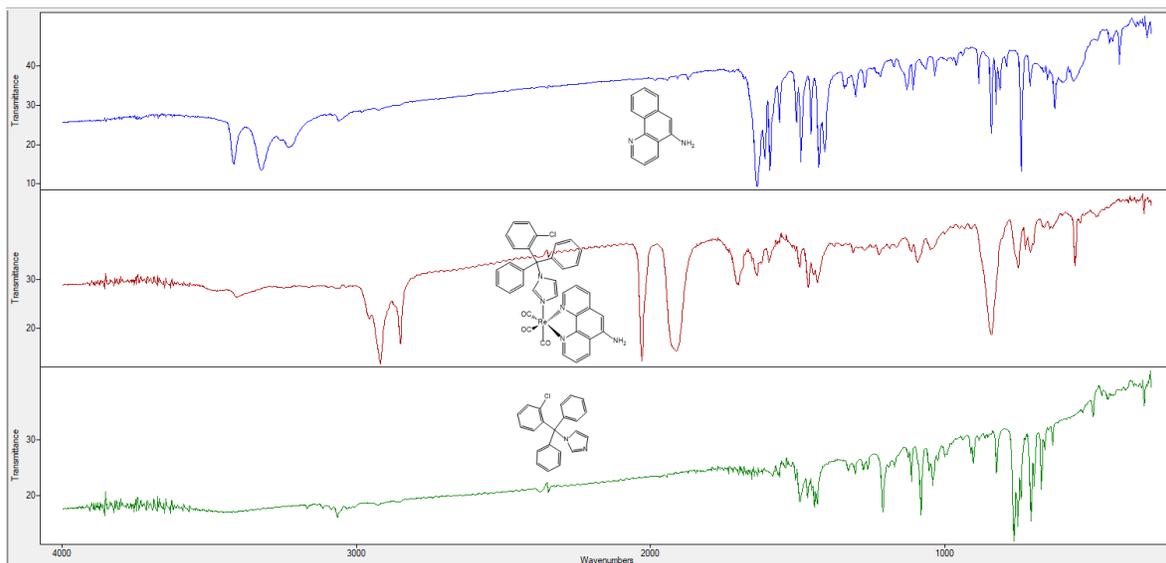


Figura A1. Comparación de espectros IR: Arriba: ligando libre aminophen, Medio: *fac*-[Re(I)(CO)₃(aminophen)(CTZ)](PF₆), Abajo: ligando libre CTZ.

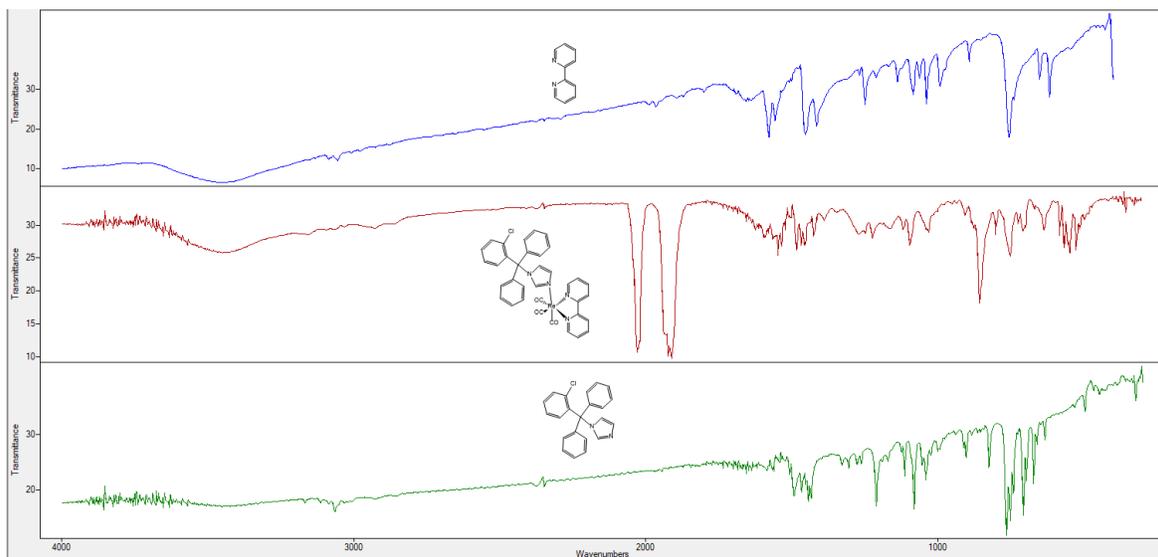
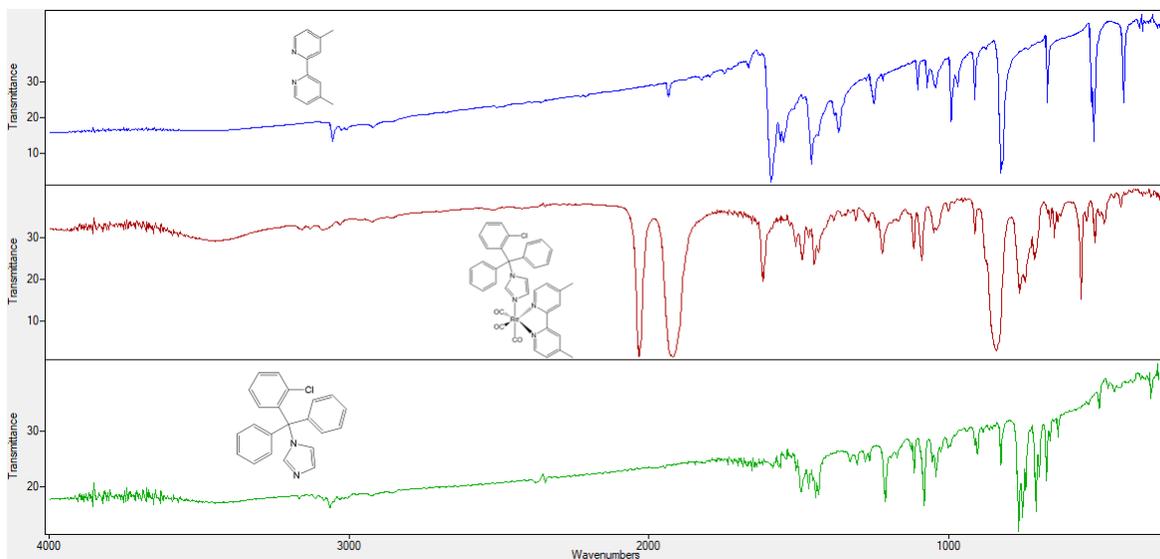
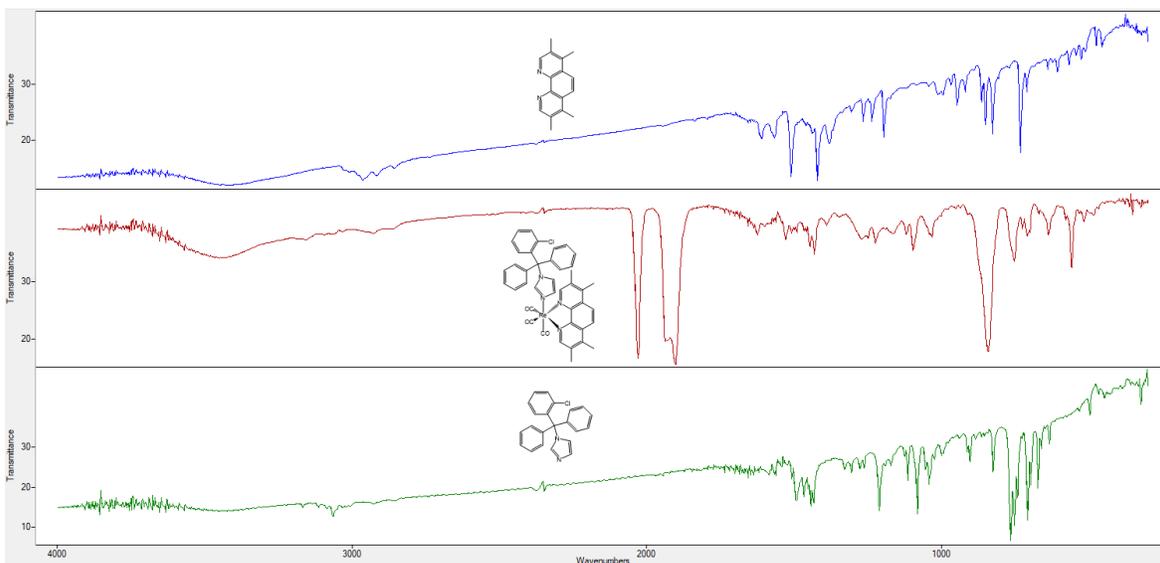


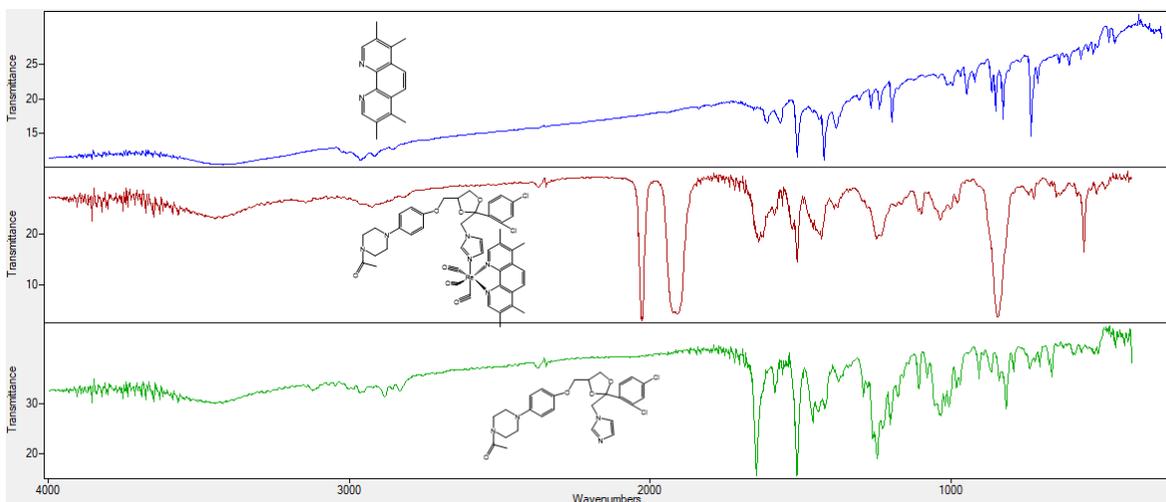
Figura A2. Comparación de espectros IR: Arriba: ligando libre bipy, Medio: *fac*-[Re(I)(CO)₃(bipy)(CTZ)](PF₆), Abajo: ligando libre CTZ.



**Figura A3. Comparación de espectros IR: Arriba: ligando libre dmb, Medio: *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(dmb)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), Abajo: ligando libre CTZ.**



**Figura A4. Comparación de espectros IR: Arriba: ligando libre tmp, Medio: *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>), Abajo: ligando libre CTZ.**



**Figura A5. Comparación de espectros IR: Arriba: ligando libre tmp, Medio: *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>), Abajo: ligando libre KTZ.**

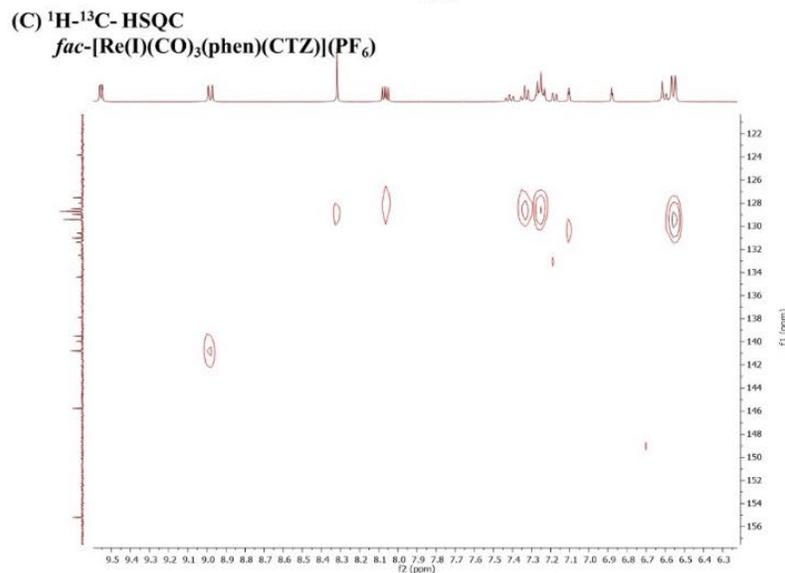
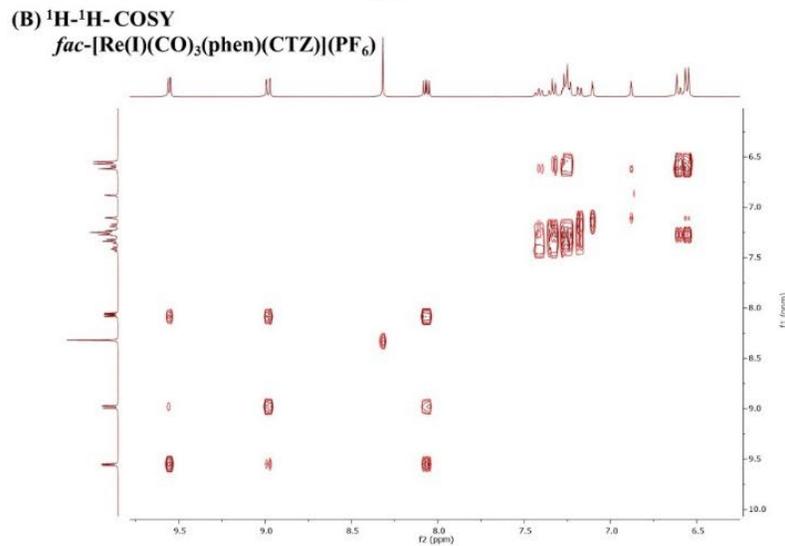
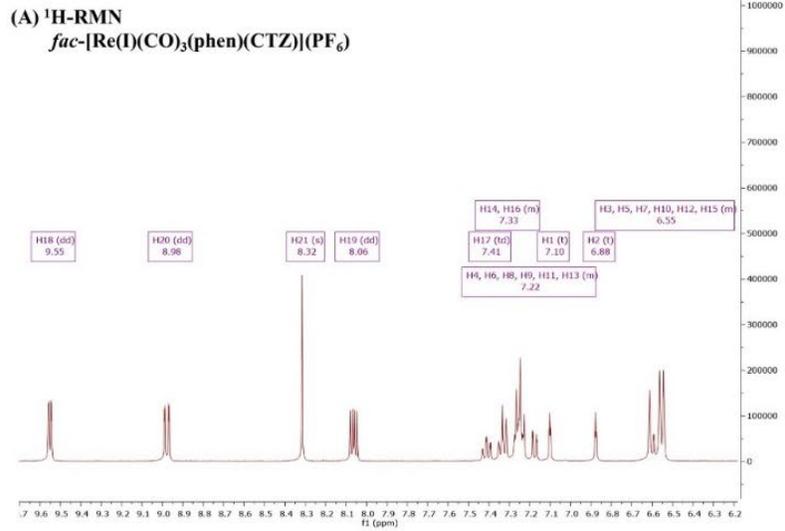


Figura A6. (A)  $^1\text{H}$ -RMN (B)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  RMN (C)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN de *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(phen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>).

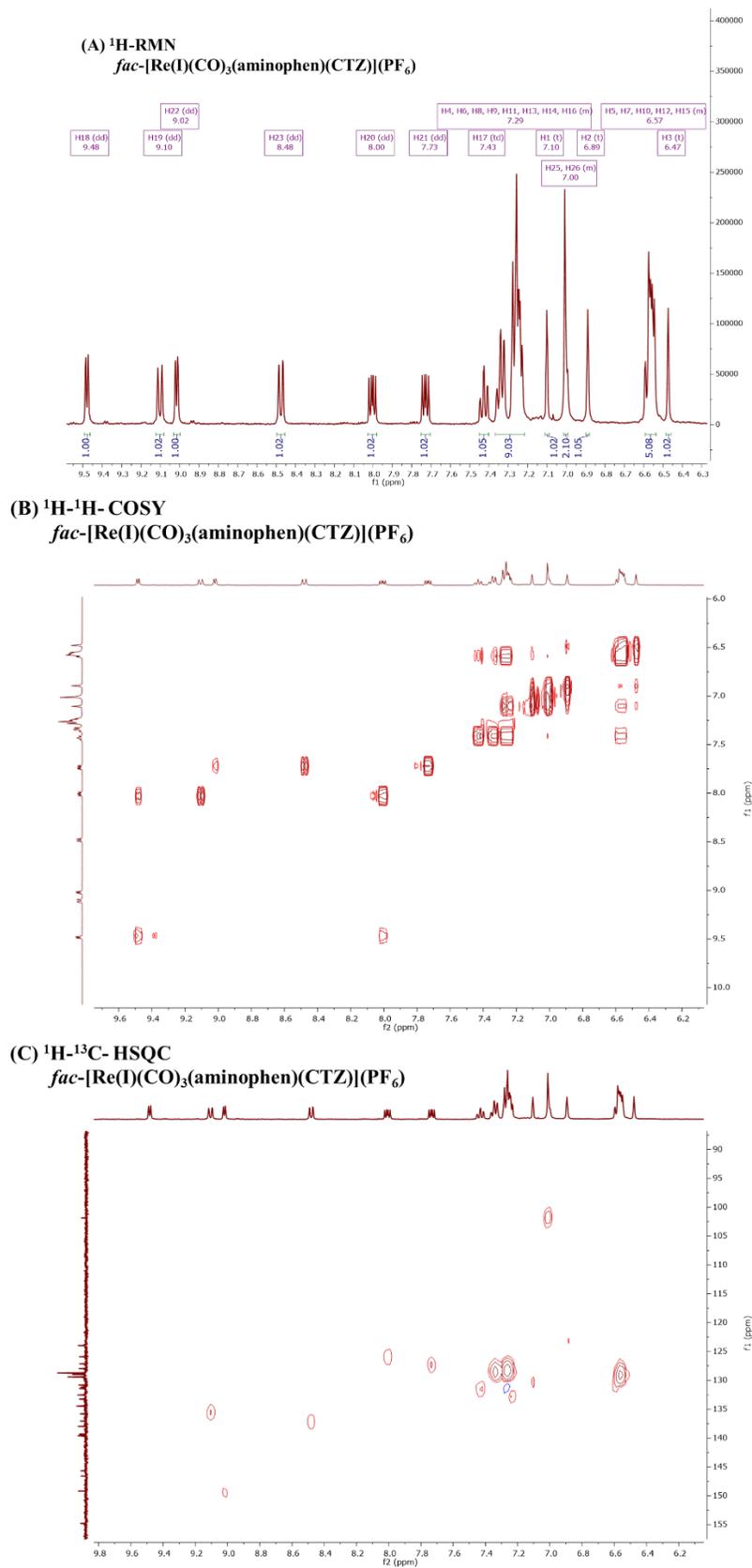


Figura A7. (A)  $^1\text{H}$ -RMN (B)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  RMN (C)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN de *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>).

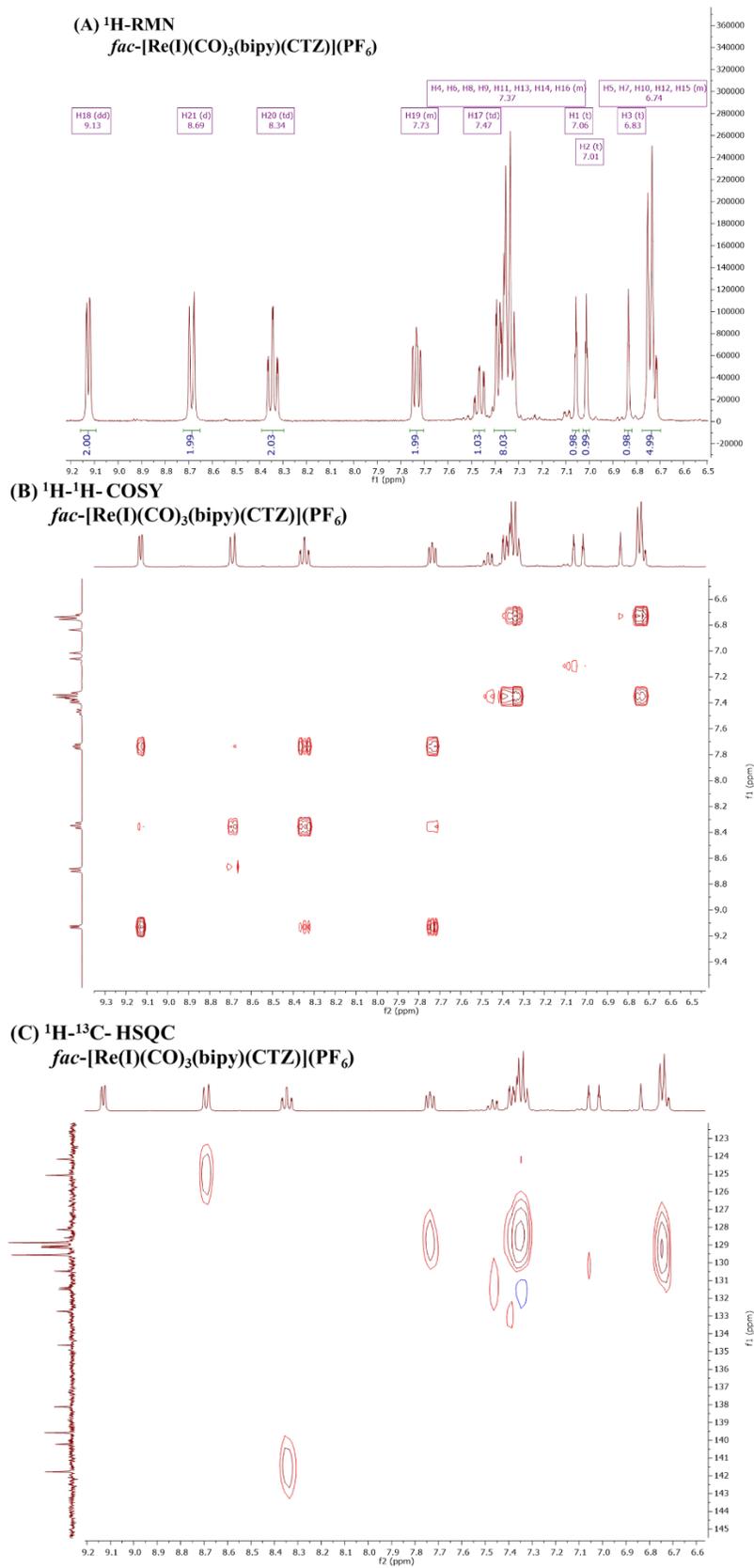


Figura A8. (A)  $^1\text{H}$ -RMN (B)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  RMN (C)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN de *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(bipy)(CTZ)](PF<sub>6</sub>).

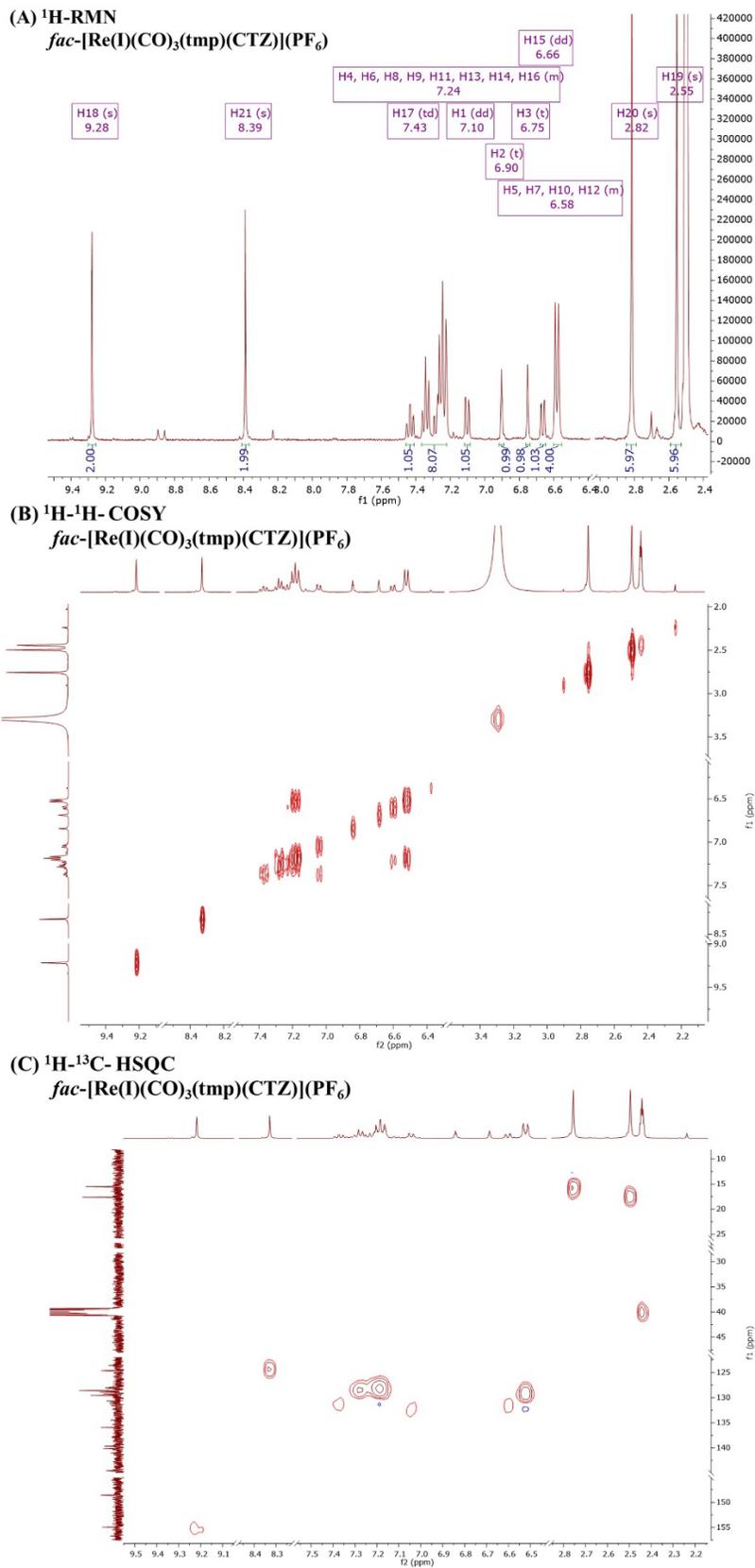


Figura A9. (A)  $^1\text{H}$ -RMN (B)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  RMN (C)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN de *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>).

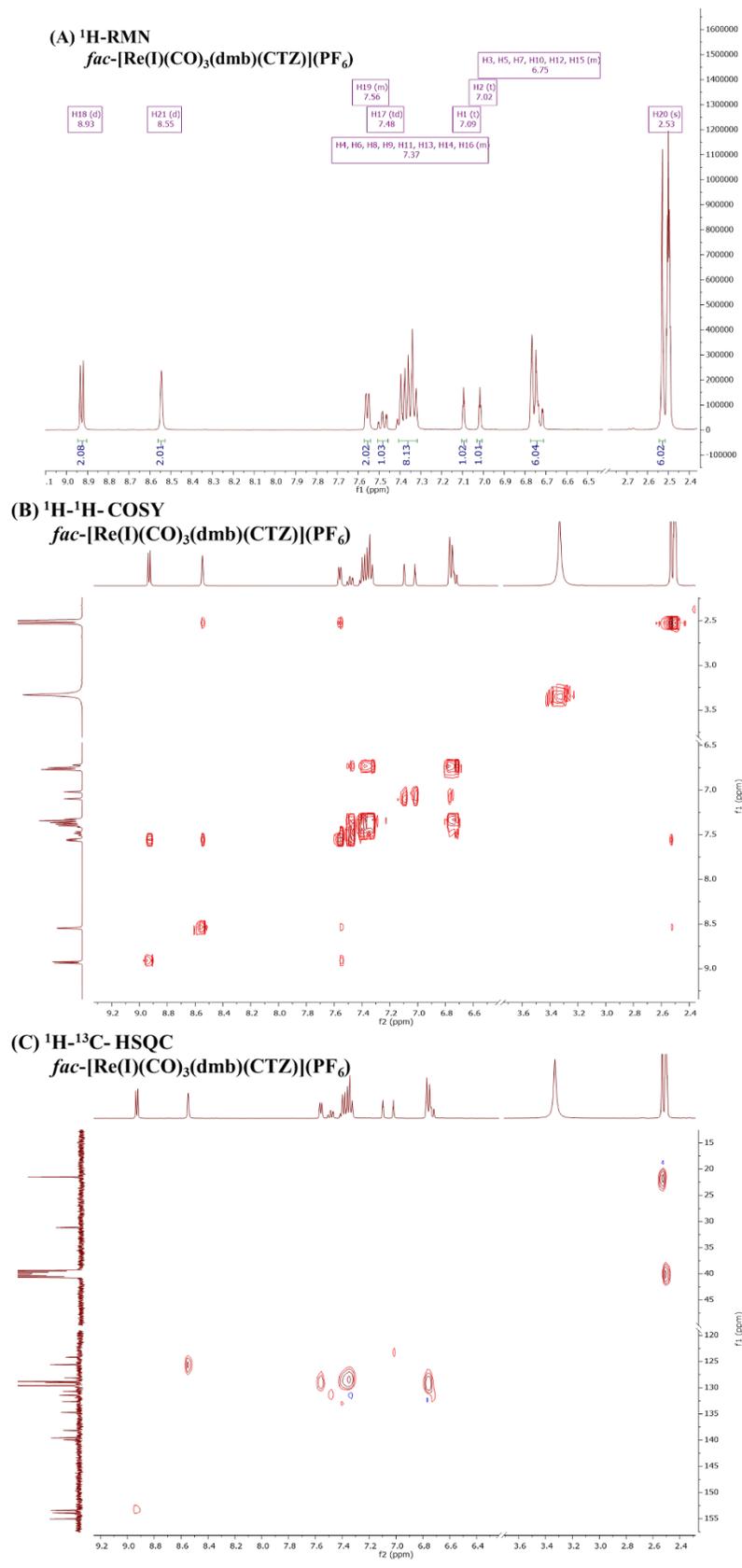
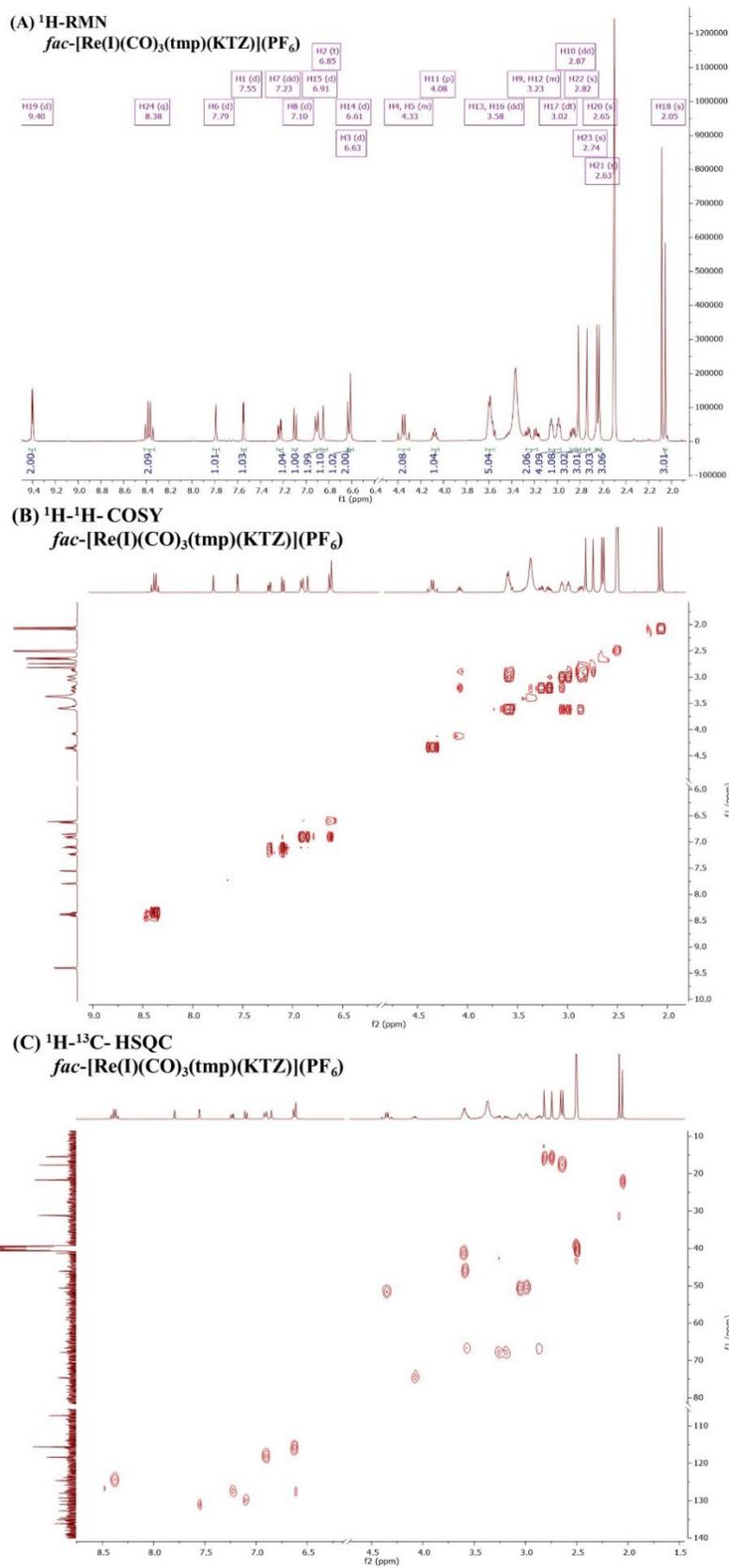


Figura A10. (A) <sup>1</sup>H-RMN (B) <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H RMN (C) <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C RMN de *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(dmb)(CTZ)](PF<sub>6</sub>).



Figuras A11. (A)  $^1\text{H}$ -RMN (B)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  RMN (C)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN de  $\text{fac-}[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3(\text{tmp})(\text{KTZ})](\text{PF}_6)$ .

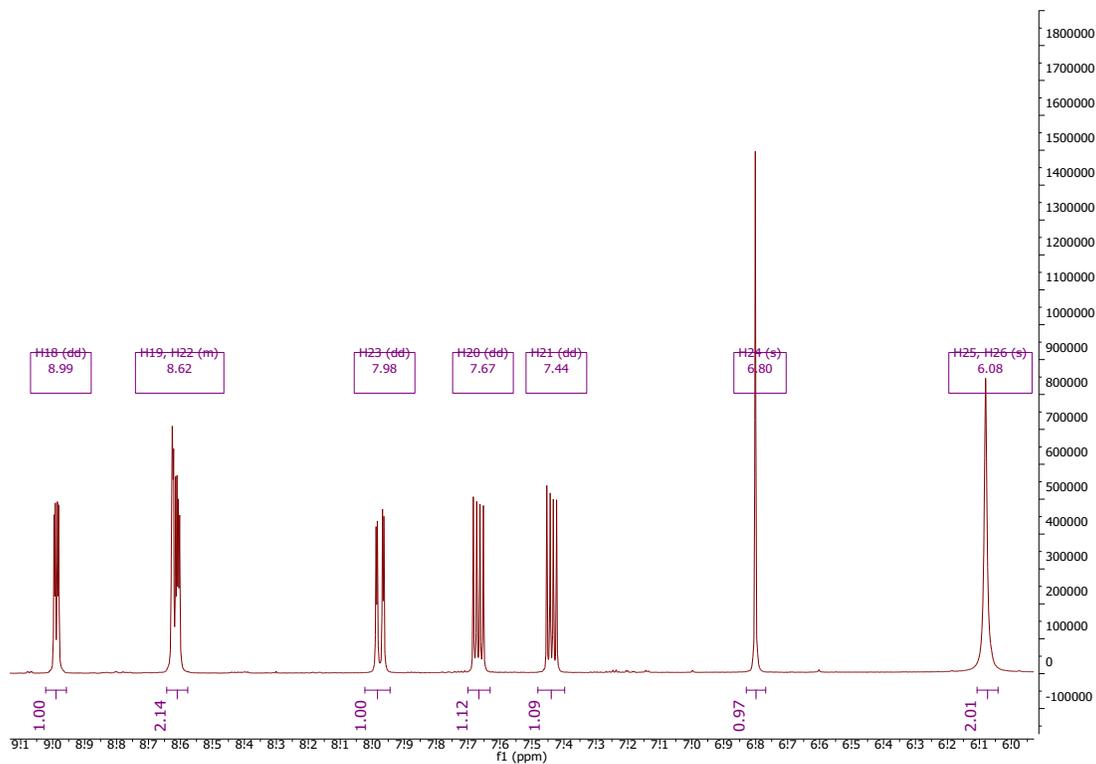


Figura A12. <sup>1</sup>H-RMN aminophen.

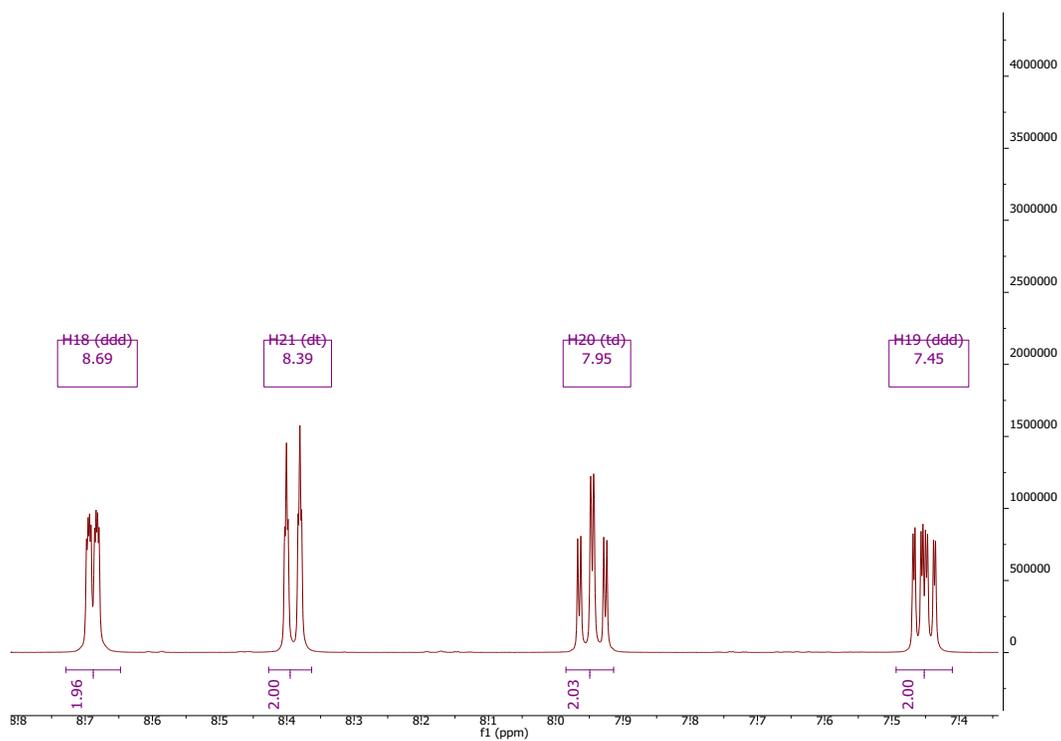


Figura A13. <sup>1</sup>H-RMN bipy.

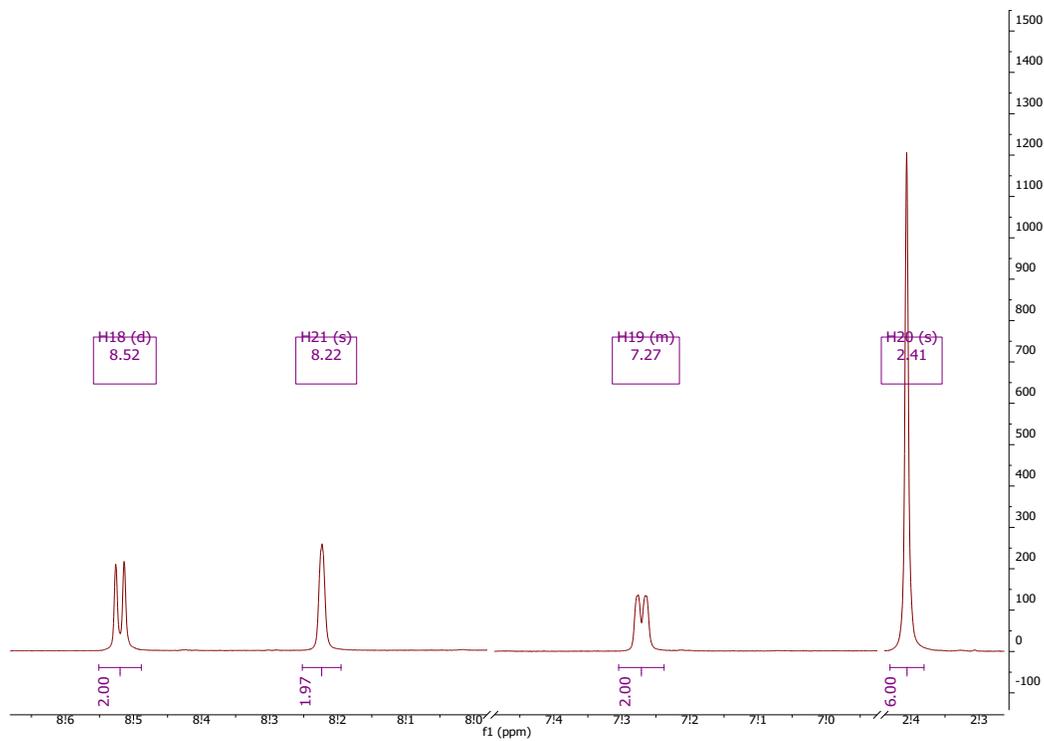


Figura A14. <sup>1</sup>H-RMN dmb.

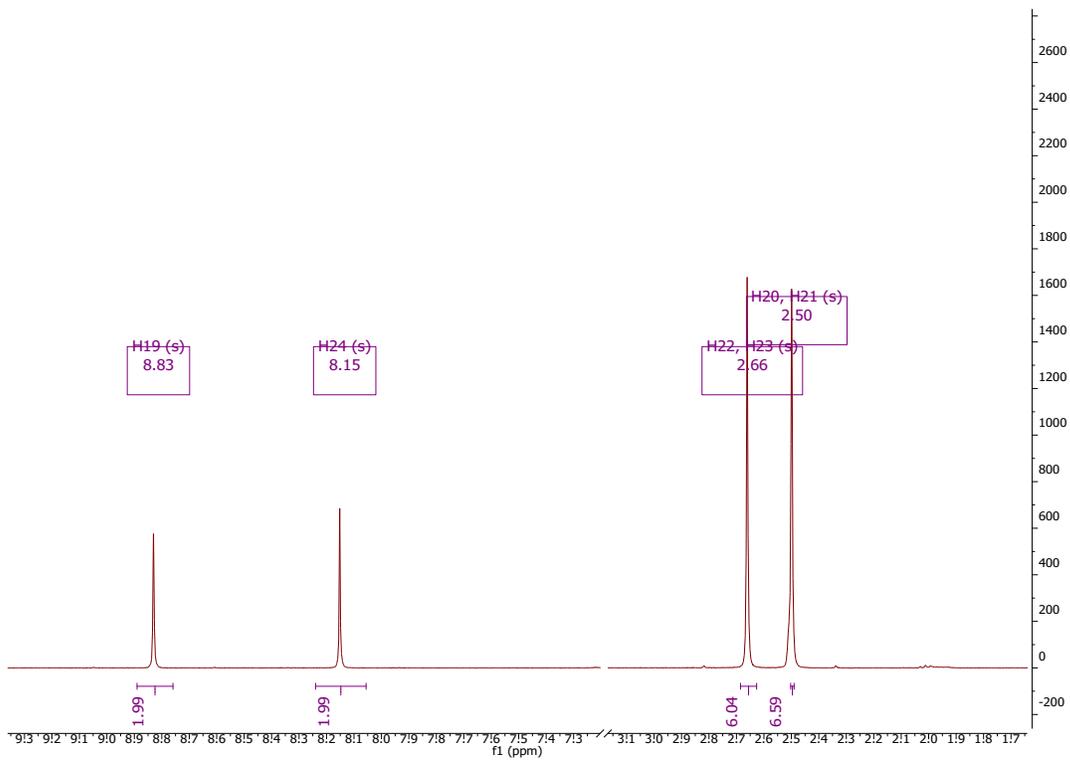


Figura A15. <sup>1</sup>H-RMN tmp.

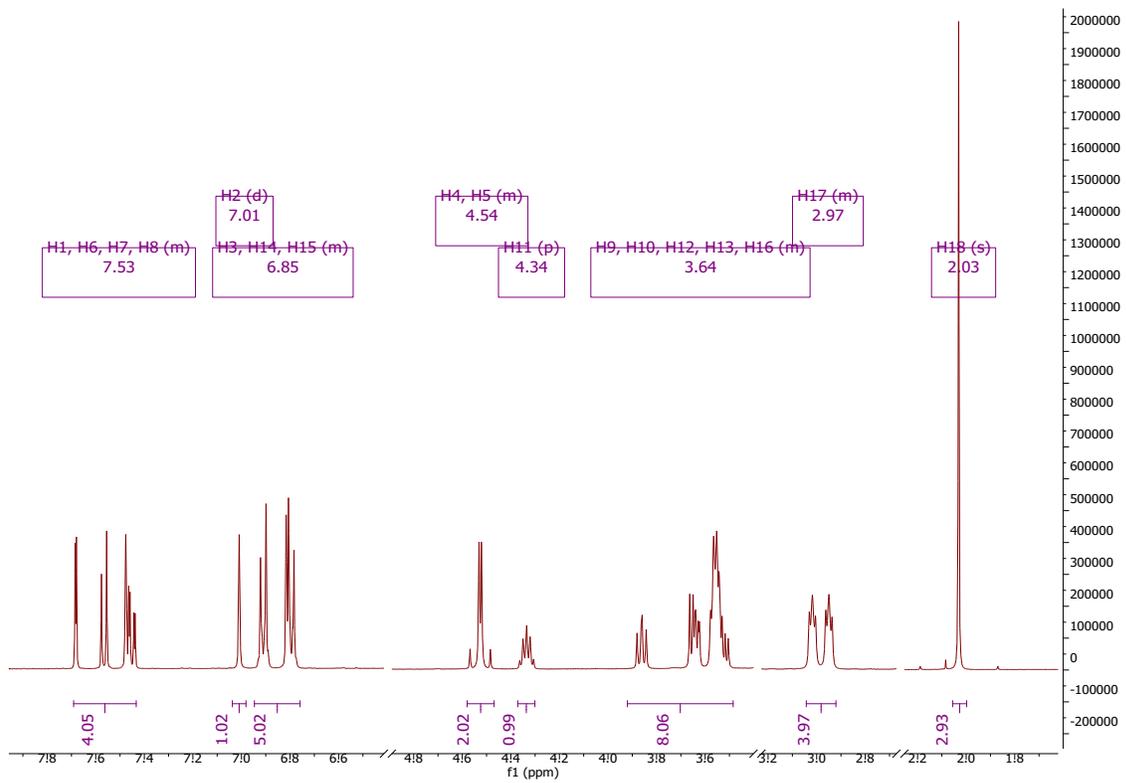


Figura A16. <sup>1</sup>H-RMN KTZ.

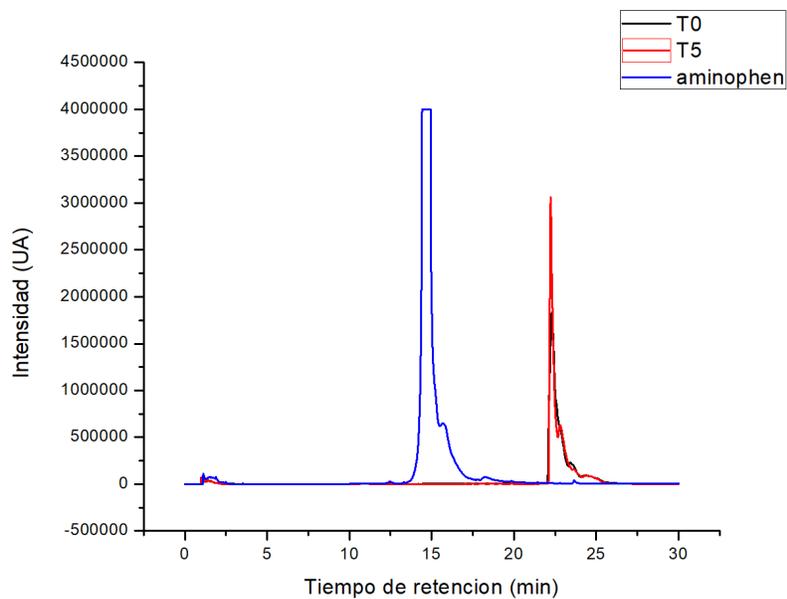


Figura A17. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en DMSO 100%

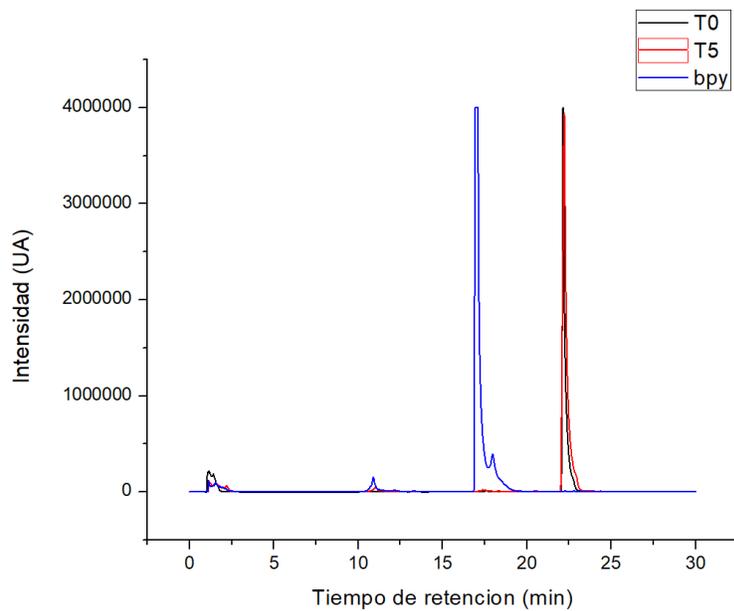


Figura A18. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(bipy)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en DMSO 100%

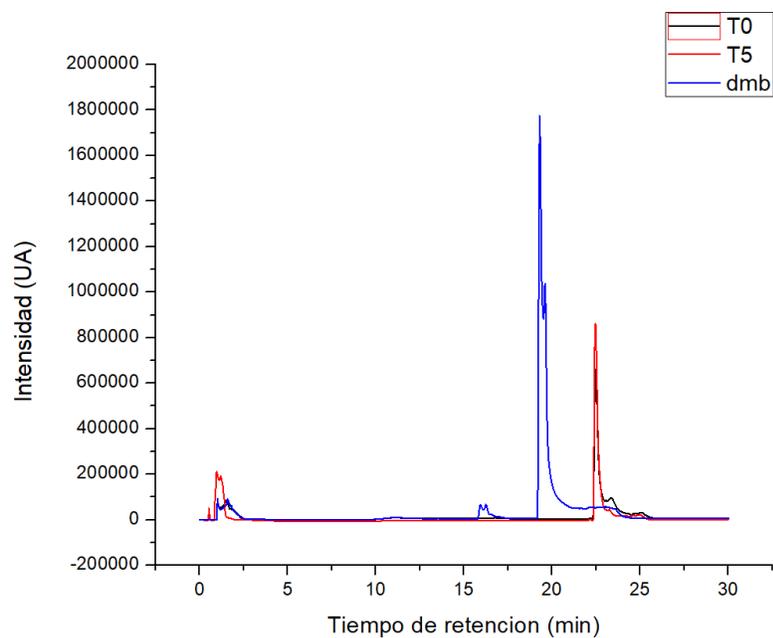


Figura A19. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(dmb)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en DMSO 100%.

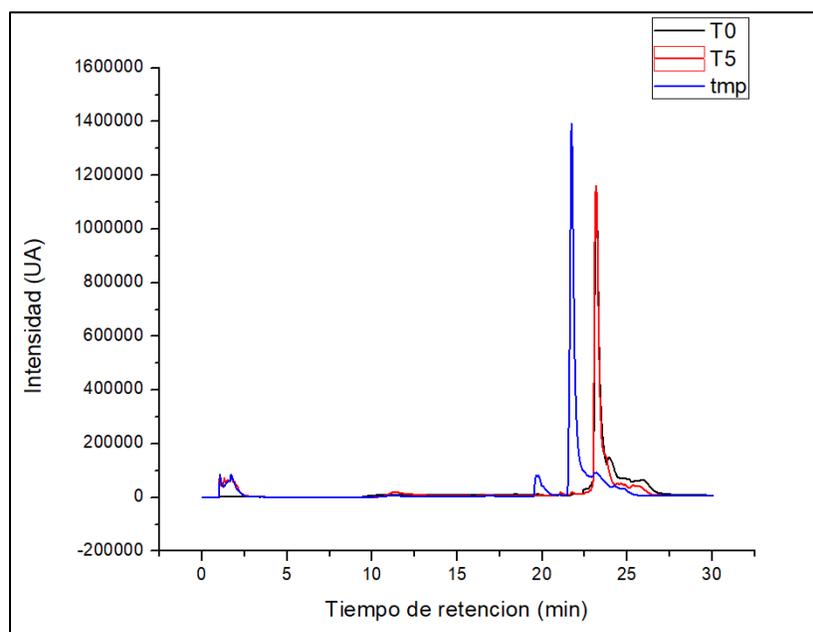
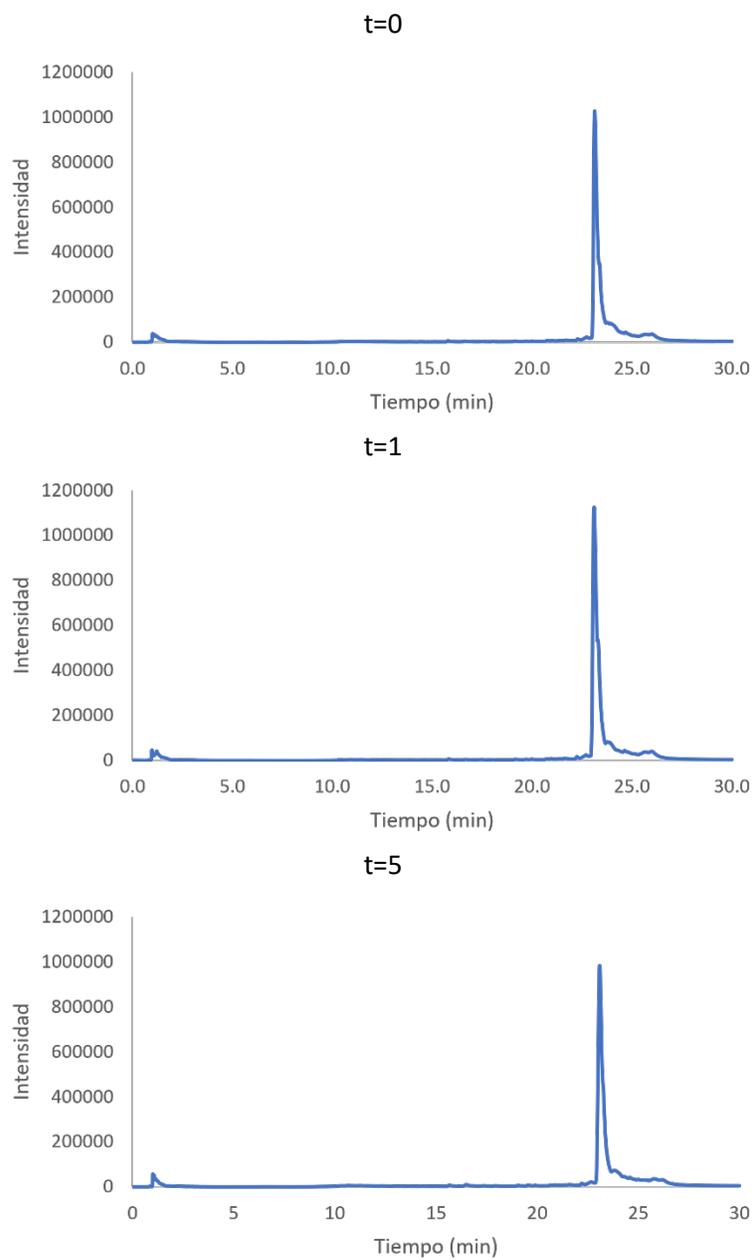


Figura A20. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en DMSO 100%.



**Figura A21.** *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en DMSO 100%.

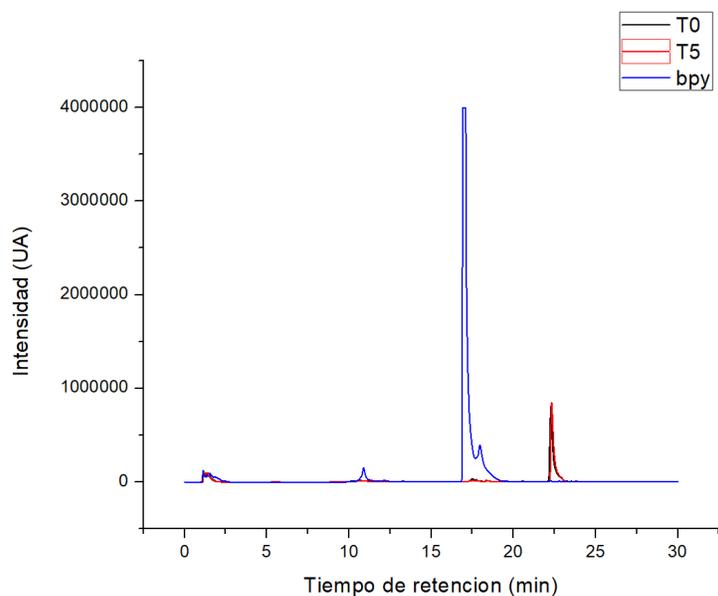


Figura A22. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(bipy)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en DMSO: medio símil biológico (50:50)

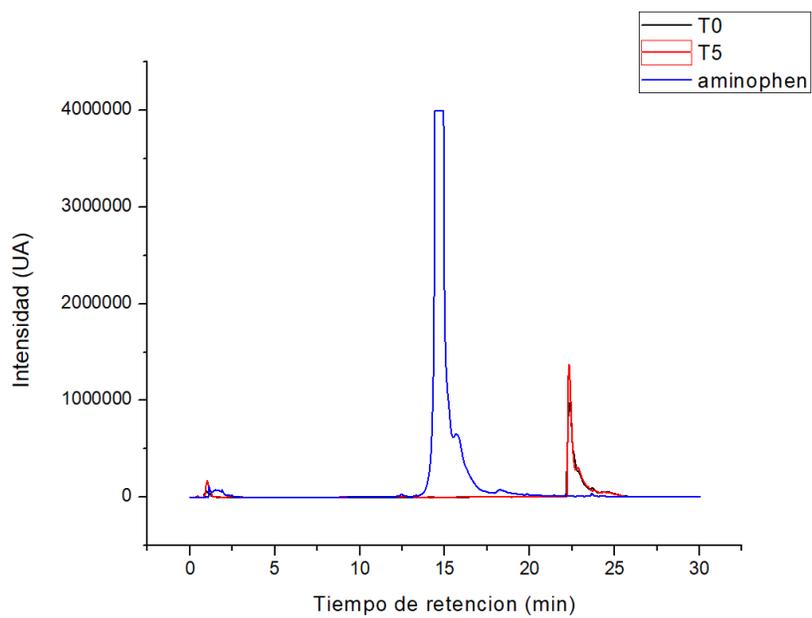


Figura A23. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en DMSO: medio símil biológico (50:50)

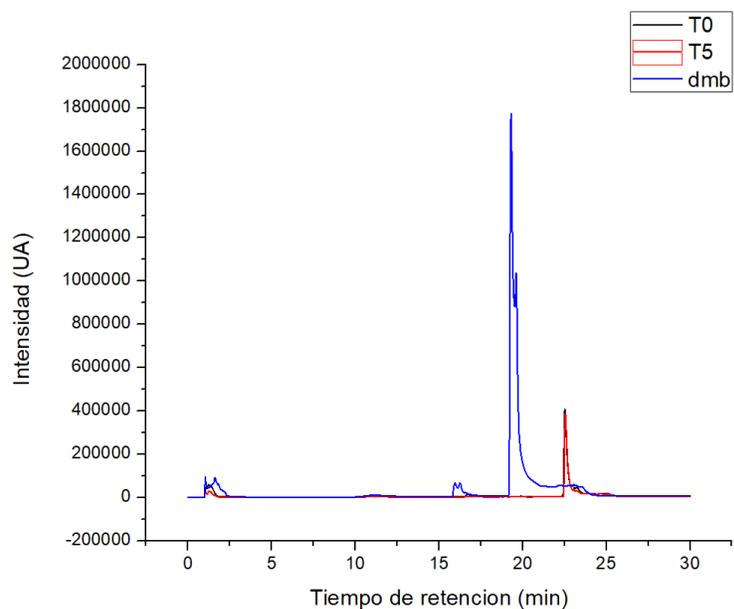


Figura A24. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(dmb)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en DMSO: medio símil biológico (50:50)

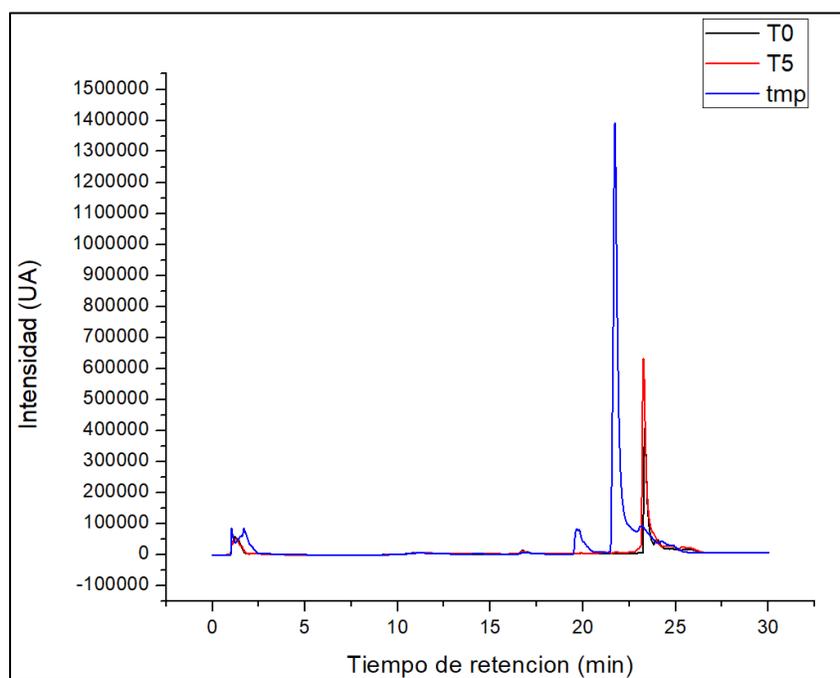


Figura A25. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en DMSO: medio símil biológico (50:50)

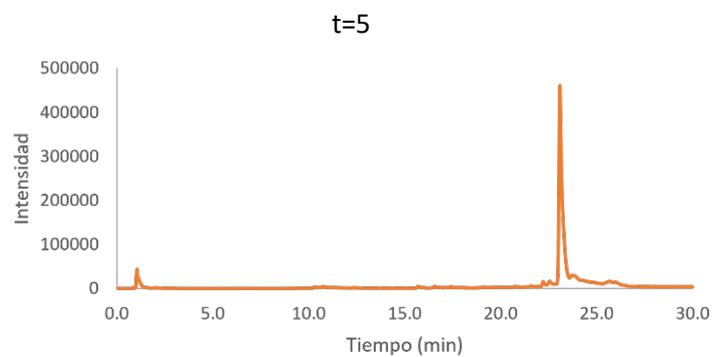
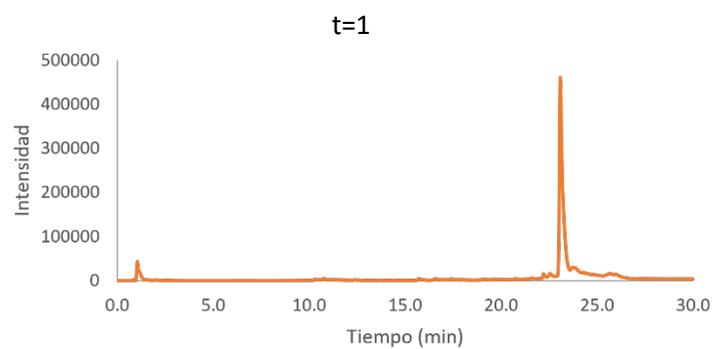
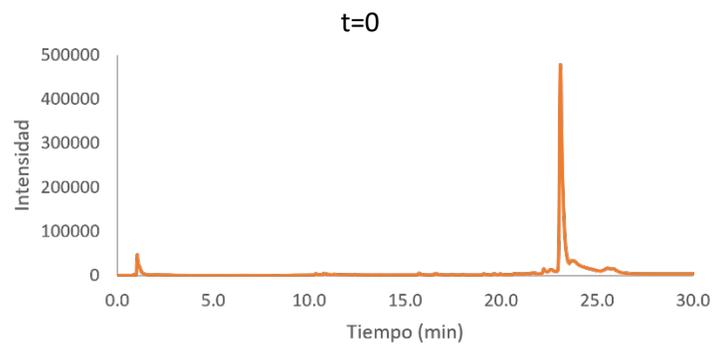


Figura A26. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en DMSO: medio símil biológico 50:50

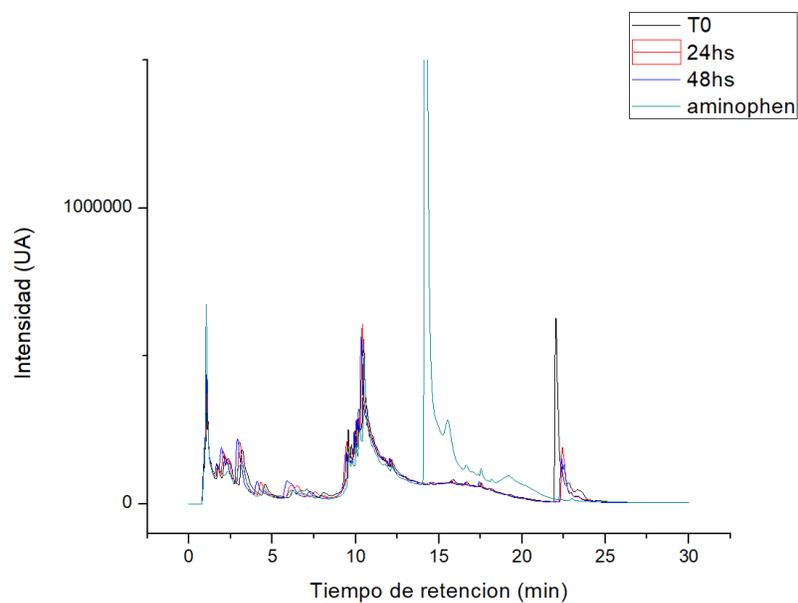


Figura A27. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(aminophen)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en BHI.

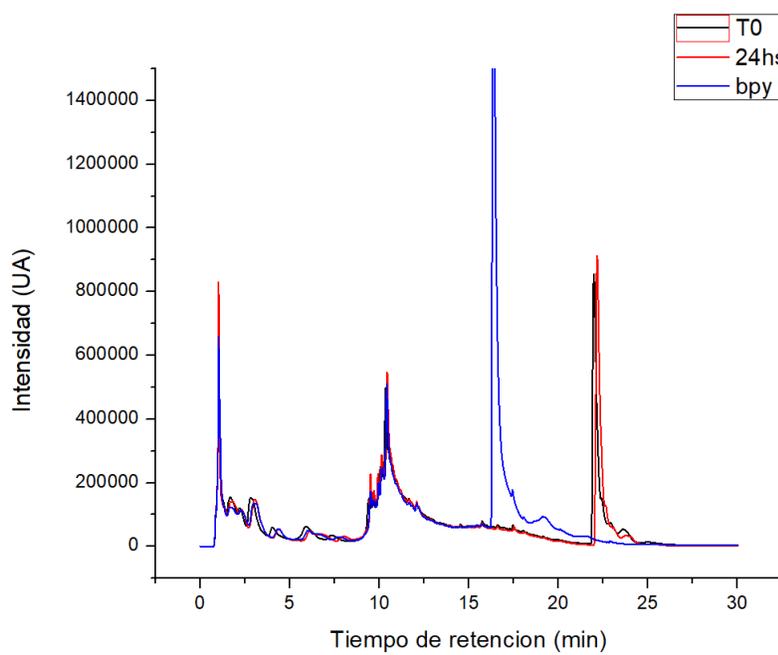


Figura A28. *fac*-[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(bipy)(CTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en BHI.

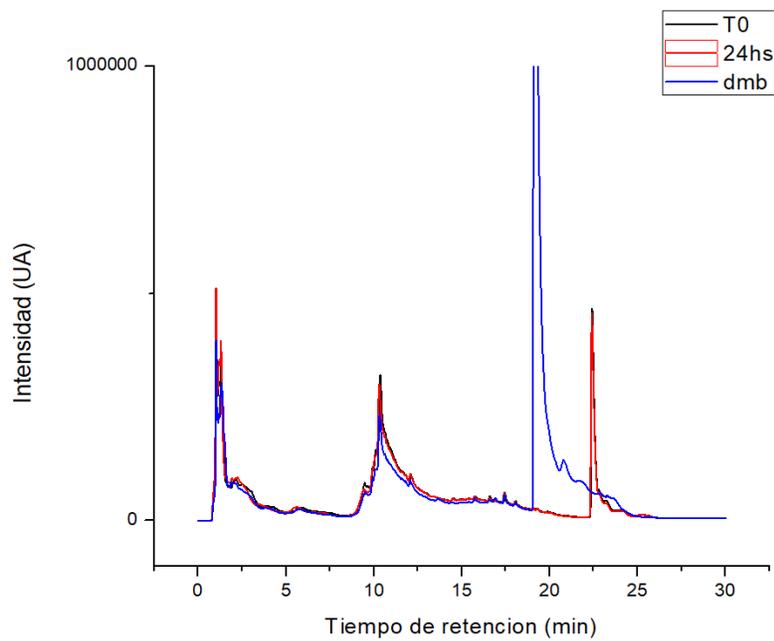


Figura A29.  $fac-[Re(I)(CO)_3(dmb)(CTZ)](PF_6)$  estabilidad en BHI.

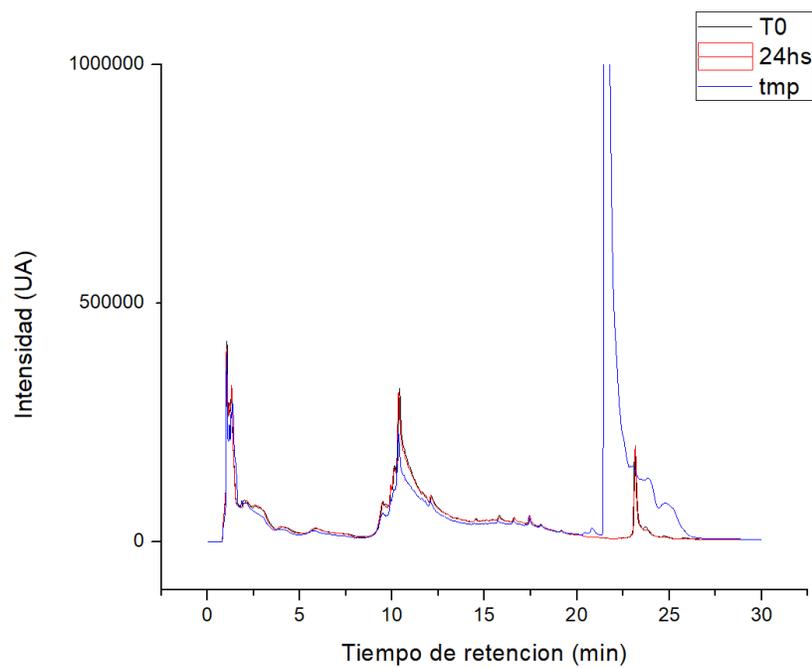


Figura A30.  $fac-[Re(I)(CO)_3(tmp)(CTZ)](PF_6)$  estabilidad en BHI.

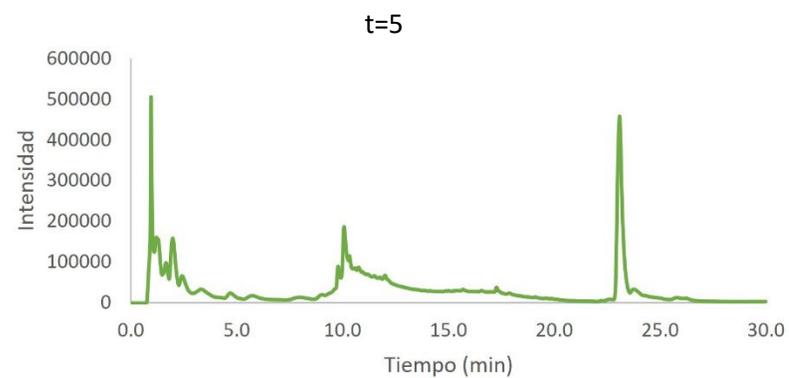
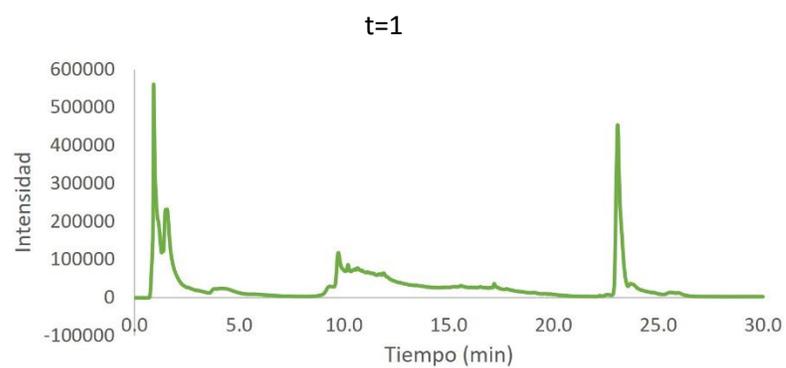
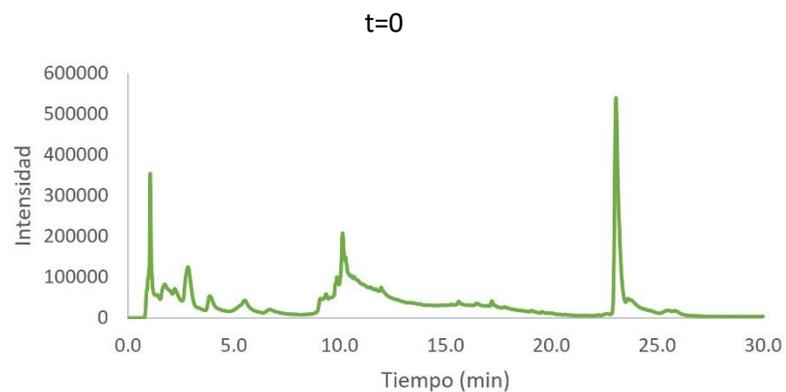


Figura A31.  $f_{ac}$ -[Re(I)(CO)<sub>3</sub>(tmp)(KTZ)](PF<sub>6</sub>) estabilidad en BHI.